

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC
À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA
MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE**

**PAR
JUDITH COSSETTE**

**IMPACT PRÉCOCE DU DIABÈTE SUR LA FONCTION DES
NEURONES GLUTAMATERGIQUES DU CERVEAU**

Août 2001

2051
1502

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

À mes parents...

SOMMAIRE

Le diabète est l'une des plus fréquentes affections humaines au cours de laquelle on note des dérèglements majeurs de l'organisme. Par exemple, un nombre imposant d'études et ce, tant cliniques que fondamentales, ont révélé que les cellules de la rétine et du système nerveux périphérique sont particulièrement vulnérables à l'état diabétique. Plusieurs analyses neuropsychologiques ont par ailleurs démontré la présence d'atteintes cognitives spécifiques chez des patients ayant souffert du diabète, lesquels sujets montrent une grande vulnérabilité aux processus neurodégénératifs, notamment lors des accidents vasculaires cérébraux (AVC). Toutefois, les mécanismes qui expliquent ces atteintes neurologiques lors du diabète restent encore énigmatiques. L'objectif général du présent travail est d'élucider les effets précoces du diabète sur le cerveau, notamment en étudiant les aspects fonctionnels des récepteurs glutamatergiques dans l'hippocampe.

Plus particulièrement, une analyse électrophysiologique des neurones à glutamate a été effectuée dans la région hippocampale de souris prédisposées génétiquement au diabète mellitus insulino-dépendant (type 1), les souris NOD/LtJ. L'analyse spécifique de cette région du cerveau réside, d'une part, dans sa grande vulnérabilité envers divers traumatismes et, d'autre part, à son rôle

prépondérant comme site de formation et de consolidation des souvenirs. On rapporte, dans le cadre de ce travail, une baisse importante de la capacité des synapses à transmettre l'influx nerveux dans l'hippocampe d'animaux prédisposés génétiquement au diabète. Or, cette perte de communication neuronale lors du diabète est vraisemblablement causée par les récepteurs glutamatergiques de type AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionate). En effet, les réponses synaptiques assurées par ces récepteurs se voient grandement altérées dans les tranches d'hippocampes provenant de souris diabétiques (NOD/LtJ). En revanche, aucun changement des réponses établies par les récepteurs de type NMDA (N-méthyl-D-aspartate) n'a été noté, suggérant la présence d'une atteinte fonctionnelle et sélective des récepteurs de type AMPA chez l'animal diabétique.

En ce qui a trait à la plasticité neuronale des neurones glutamatergiques lors du diabète, on note une réduction importante de la capacité de la région CA₁ de l'hippocampe à générer la LTP ("Long term potentiation") suite à une période transitoire d'activité téтанique. Cette perte de LTP se voit grandement renversée par l'implantation de pastille d'insuline, soulevant que l'atteinte à la plasticité neuronale découle de l'état hyperglycémique ou de l'hypoinsulinémie. La

vulnérabilité fonctionnelle des neurones glutamatergiques ne se voit toutefois pas altérée par une période d'hypoxie chez l'animal diabétique.

Dans l'ensemble, les résultats de la présente étude indiquent qu'une atteinte spécifique des mécanismes électrophysiologiques contribue à l'apparition des déficits cognitifs chez les patients diabétiques.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	ii
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xii
REMERCIEMENTS.....	xiv
 CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	 1
1.1. Mise en situation de la problématique	2
1.2. Diabète et son impact sur la santé	3
1.2.1. Complications associées au diabète mellitus	5
1.2.1.1. Complications neurologiques.....	6
1.2.2. Modèles animaux pour l'étude du diabète.....	10
1.3. Impact du diabète sur les aspects neurochimiques du cerveau	13
1.3.1. Système catécholaminergique.....	13
1.3.2. Système cholinergique.....	17
1.3.3. Système sérotoninergique	19
1.3.4. Système glutamatergique	20

1.3.4.1. Potentialisation synaptique à long terme	26
1.4. Stress oxydatif et le diabète.....	32
1.4.1. Influence du Ca^{2+} sur les récepteurs NMDA : impact sur le stress oxydatif	37
1.5. Objectifs de la recherche.....	40
1.5.1. Objectifs spécifiques.....	40
1.5.2. Importance et originalité de la recherche	44
 CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES	45
2.1. Préparation du tissu cérébral	46
2.2. Étude électrophysiologique des coupes d'hippocampe de souris	50
2.2.1. Études des récepteurs AMPA et NMDA avec une intensité électrique croissante.....	51
2.2.2. Impact du diabète sur la LTP hippocampale induite par stimulation tétranique.....	52
2.2.3. Impact du diabète sur la LTP hippocampale induite par dépolariation chimique	53
2.2.4. Procédure d'hypoxie sur tranches d'hippocampe	54

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS	55
3.1.1. Impact du diabète sur la fonction excitatrice de l'hippocampe.....	56
3.1.2. Impact du diabète sur la plasticité électrophysiologique de l'hippocampe.....	61
3.1.2.1. Analyse de la LTP induite par des stimulations électriques de hautes fréquences.....	61
3.1.2.2. Analyse de la LTP induite par dépolarisation chimique	68
3.1.3. Impact du diabète sur la récupération de la transmission neuronale suite à un épisode transitoire d'hypoxie.....	70
CHAPITRE 4 : DISCUSSION ET CONCLUSION	75
4.1.1. Induction de la LTP chez les souris NOD/LtJ	79
4.1.2. Maintien de la LTP chez les souris NOD/LtJ	80
4.1.3. Dommages à la communication neuronale dans l'hippocampe des souris NOD/LtJ	84
4.2. Conclusion.....	87
RÉFÉRENCES	88

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Impacts néfastes du diabète	7
Tableau 2. Effets du diabète insulino-dépendant sur l'organisme	12
Tableau 3. Pharmacologie de quelques sous-types de récepteurs pour les neurotransmetteurs	14
Tableau 4. Effets physiopathologiques des récepteurs glutamatergiques	27

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Principales composantes des systèmes cholinergiques centraux	16
Figure 2. Aspect pharmacologique de la transmission synaptique assurée par le neurotransmetteur glutamate	23
Figure 3. Représentation schématique de l'approche expérimentale pour l'analyse électrophysiologique de la structure hippocampale.....	28
Figure 4. Rôle de la calpaine et de la NO synthase dans la production de radicaux libres.....	38
Figure 5. Représentation schématique d'une chambre électrophysiologique	49
Figure 6. Impact du diabète sur la réponse glutamatergique assurée par les récepteurs de type AMPA.....	58
Figure 7. Impact du diabète sur la réponse glutamatergique assurée par les récepteurs de type NMDA	60

Figure 8. Degré de potentialisation neuronale dans des tranches d'hippocampes de souris NON/LtJ.....	63
Figure 9. Degré de potentialisation neuronale dans des tranches d'hippocampes de souris NON/LtJ et NOD/LtJ diabétiques.....	65
Figure 10. Degré de potentialisation neuronale dans des tranches d'hippocampes de souris NOD/LtJ diabétiques et NOD/LtJ diabétiques traitées à l'insuline	66
Figure 11. Degré de potentialisation neuronale dans des tranches d'hippocampes de souris contrôles (NON/LtJ), diabétiques (NOD/LtJ) et diabétiques traitées à l'insuline (NOD/LtJ).....	67
Figure 12. Récupération de la réponse synaptique après une période transitoire d'augmentation de la concentration de KCl dans des tranches d'hippocampes chez des souris NON/LtJ et NOD/LtJ diabétiques	69

Figure 13. Récupération de la réponse synaptique après une période transitoire d'hypoxie dans des tranches d'hippocampes chez des souris NON/LtJ.....	72
Figure 14. Récupération de la réponse synaptique après une période transitoire d'hypoxie dans des tranches d'hippocampes chez des souris NON/LtJ et NOD/LtJ.....	73

Liste des abréviations

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionate
AP5	D-2-amino-5-phosphonopentanoate
BMAA	β -N-méthyl-amino-L-alanine
Ca ²⁺	calcium
CA ₍₁₋₄₎	corne d'Ammon
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
CO	monoxyde de carbone
DID	diabète insulino-dépendant
DNID	diabète non insulino-dépendant
DNQX	6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione
GLU	glutamate
³ H-AMPA	AMPA tritié
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
Hz	Hertz
Mg ²⁺	ion magnésium
MK-801	5-méthyl-10,11-dihydro-5H-dibenzocyclohepten-5,10-iminemaleate

MPTP	1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
NBQX	1,2,3,4-tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo benzoquinoxaline-7-sulphonamide
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NO•	monoxyde d'azote
NOD	diabétique non obèse
NON	non diabétique non obèse
O ₂ ^{•-}	ion superoxyde
OH•	radical hydroxyle
PLA ₂	phospholipase A ₂
PPSE	potentiels postsynaptiques excitateurs
SNC	système nerveux central
SHF	stimulation électrique de haute fréquence
STZ	streptozotocine

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Guy Massicotte pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour l'aide qu'il m'a prodigué et de la confiance qu'il a eu en mes capacités. J'adresse également des remerciements au Docteur François Trudeau pour sa collaboration. Puis merci à la compagnie Purecell Technologies Inc. et au Docteur Guy Massicotte pour leur support financier dans la réalisation de mes études.

Je remercie sincèrement Othman Ghribi pour m'avoir enseigné la technique d'électrophysiologie en plus des quelques leçons de vie et de son amitié si précieuse. Un merci tout spécial est aussi adressé à Éric Dufour, Marie-Laure Escudéro, Barbara Valastro et Luc Lapierre pour avoir eu la gentillesse de lire et apporter certaines corrections à ce document, sans compter mes lecteurs et correcteurs d'orthographe ; Luc Marchand, Julie Cossette, Jocelyne Quessy et Martine Goulet.

Je tiens également à remercier mon amour Guy Therrien pour les belles figures qu'il a dessinées avec tant de détails, et également de m'avoir permis de travailler à ses côtés, avec l'ordinateur que ma mère Jocelyne m'a si gentiment prêté.

Merci à mes parents pour leur support autant affectif que financier. Merci à ma famille pour leur amour inconditionnel. Et un merci en particulier à mes oncles Yvon et Jean-Marc ainsi qu'à mes tantes Gisèle, Josée, Christiane, Solange, Lise et Lucie pour leurs encouragements. Sans oublier mes amis qui m'ont soutenu, compris, encouragé, pour leur tendresse et leur présence ; Éric, Barbara, Othman, Marie-Laure, Martine, Mylène (Gagnon), Meghan (Graham), Claudia (Gagnon), Daniel (Gélinas) et Sylvie (Gélinas). Ils m'ont toujours soutenu moralement et ont su me donner un coup de pouce en temps nécessaire.

Un merci tout spécial à Luc Marchand pour son aide, son humour et pour tous les bons moments de discussions que nous avons partagé. Et merci à tous les gens que j'ai pu côtoyer dans le laboratoire et qui ont rendu l'ambiance superbe ; Martine, Sonia, Karine, Isabelle.

Afin de terminer en beauté, je voudrais remercier Monique Roberge et Christine Roberts pour m'avoir inspiré dans cette lutte contre le diabète.

INTRODUCTION

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 MISE EN SITUATION DE LA PROBLÉMATIQUE

Plusieurs travaux ont démontré l'importance du neurotransmetteur glutamate (et de ses récepteurs) dans le contrôle de fonctions élémentaires du cerveau, notamment dans les processus d'apprentissage et de mémorisation. Par ailleurs, un bon nombre d'études électrophysiologiques ont démontré que l'activation des récepteurs glutamatergiques peut contribuer largement à la production de la LTP, un modèle synaptique de mémorisation. Sur le plan pathologique, l'importance des récepteurs glutamatergiques dans l'apparition de la neurodégénérescence a également été soulevée. En effet, certaines recherches prouvent que l'activation excessive des récepteurs glutamatergiques peut engendrer des effets particulièrement délétères pour les neurones. Ces effets néfastes seraient attribuables, en partie, à la capacité qu'ont les récepteurs glutamatergiques à favoriser une accumulation inhabituellement élevée d'ions calcium dans la structure postsynaptique (Coyle & Puttfarcken, 1993 ; Siesjo, 1998 ; Siesjo et al., 1995).

Plusieurs analyses neuropsychologiques ont révélé la présence d'atteintes cognitives chez les patients diabétiques. On retrouve également dans la littérature de nombreuses études montrant que les sujets diabétiques sont particulièrement vulnérables à la neurodégénérescence, notamment lors d'accidents vasculaires cérébraux. Au niveau biochimique, des expériences récentes ont démontré la présence de modifications précoces des récepteurs glutamatergiques chez la souris diabétique. En effet, dans de nombreuses régions du cerveau, incluant l'hippocampe, les récepteurs glutamatergiques de type NMDA et AMPA se voient régulés à la hausse chez des souris prédisposées génétiquement au DID. Or, notre hypothèse serait que les modifications biochimiques précoces des récepteurs glutamatergiques pourraient être à l'origine des dérèglements neurologiques lors du diabète.

1.2 DIABÈTE ET SON IMPACT SUR LA SANTÉ.

La population humaine ne cesse de grandir de même que les maladies qui lui sont associées. En outre, l'allongement de l'espérance de vie, la généralisation du mode de vie et les habitudes alimentaires favorisant l'obésité sont des conditions susceptibles de développer le diabète. Dans les pays industrialisés, cette pathologie est reconnue comme étant la troisième cause de mortalité après les

accidents cardiovasculaires et le cancer. À l'échelle mondiale, environ 110 millions de personnes souffrent du diabète sucré ; ce type de diabète est également appelé diabète mellitus, du grec *diabetes*, «passer à travers », et du latin *melitus* «doux comme le miel » (Guilhaume & Perlemuter, 1980). Ce nom évoque un symptôme majeur de la maladie connu depuis plus de 2000 ans : la présence de sucre dans l'urine. Selon Santé Canada, le diabète est diagnostiqué chez plus d'un million et demi de personnes et une personne diabétique de plus est comptée toutes les huit minutes (60 000 nouveaux cas par année). De plus, le nombre de Canadiens qui ignorent en être atteints est estimé à 750 000. Des coûts énormes sont rattachés à cette pathologie sérieuse et grandissante. Les traitements visent présentement à normaliser autant que possible la glycémie, mais il reste un important effort de recherche à accomplir dans le domaine du traitement du diabète.

Le diabète est une maladie chronique à laquelle est associé un défaut d'utilisation ou de sécrétion de l'insuline, une hormone produite par le pancréas. La conséquence de ce problème est un taux de glucose élevé dans le sang (hyperglycémie). On distingue généralement deux grands types de diabète, l'un associé à une carence en insuline, et l'autre à un défaut d'utilisation de cette hormone. La première forme de diabète, appelée insulino-dépendant (DID) (ou de

type 1), semble être une combinaison de plusieurs facteurs ; une perturbation du système immunitaire, une infection souvent virale et une certaine prédisposition génétique. Dans le cas du diabète de type 1, le pancréas produit peu ou pas du tout d'insuline, ce qui entraîne une augmentation de glucose sanguin. Dans la deuxième forme de diabète, appelée non insulino-dépendant (DNID) (ou de type 2), il y a une incapacité de l'organisme à utiliser l'insuline sécrétée par le pancréas. L'excès de poids et l'hérédité sont des facteurs favorisant son développement (Tortora & Grabowski, 1994). Deux autres formes de diabète, moins fréquentes mais aussi importantes, sont rencontrées : le diabète gestationnel qui peut se développer chez une femme enceinte et le diabète secondaire, qui peut être provoqué par différentes affections ou par la prise de certains médicaments (Lefebvre, 1988).

1.2.1 Complications associées au diabète mellitus.

Les complications qui peuvent affecter les patients après plusieurs années touchent principalement les systèmes vasculaires, nerveux et rénaux. Cette maladie peut aussi affecter la capacité du corps à combattre les infections (Lefebvre, 1988). Des sujets souffrant du DID, qui autrefois seraient décédés, survivent aujourd'hui mais avec une ou plusieurs affections. Ces complications

sont liées à la durée et à la gravité de l'hyperglycémie, d'où l'intérêt de bien la contrôler. En soit, le diabète n'est pas dramatique, cependant, il engendre d'autres maladies, qui elles le sont. Le tableau 1 résume les effets néfastes du diabète sur l'organisme.

1.2.1.1 Complications neurologiques.

Bien que plusieurs discussions au sujet des complications associées au diabète insulino-dépendant soient concentrées sur les yeux, les reins, le système cardiovasculaire et les nerfs périphériques (Pirart, 1978), il devient de plus en plus clair que l'intégrité du système nerveux central (SNC) peut être sérieusement affectée chez certains patients diabétiques. En effet, une série d'études électrophysiologiques (Gilhaus, Daweke, & Lülldorf, 1973 ; Haumont, Dorchy, & Pelc, 1979) et neuropsychologiques (Meuter, Thomas, & Gruneklee, 1980 ; Ryan, Vega, & Longstreet, 1984) ont démontré que certaines dysfonctions du SNC peuvent apparaître lors de la maladie. De plus, les individus qui développent le diabète tôt dans leur vie seraient plus susceptibles de montrer des anormalités neuropsychologiques. Dans cette optique, Ryan et ses collaborateurs (1985) ont soumis plusieurs groupes de patients diabétiques à divers tests d'apprentissage et de mémoire (mémoire visuelle, symbole-chiffre et tests verbaux).

Tableau 1
Impacts néfastes du diabète

Complications oculaires	<ul style="list-style-type: none"> • rétinopathie • cécité
Complications rénales	<ul style="list-style-type: none"> • maladies rénales • insuffisance rénale
Complications cardiovasculaires	<ul style="list-style-type: none"> • hypertension • mauvaise circulation sanguine • artériosclérose
Complications neurologiques	<ul style="list-style-type: none"> • perte de sensibilité aux extrémités • neuropathie périphérique • ulcères aux pieds • gangrène • difficulté érectile • problèmes cognitifs
Autres complications	<ul style="list-style-type: none"> • affecte la capacité du corps à combattre les infections
Prédispositions	<ul style="list-style-type: none"> • maladie d'Alzheimer • accidents vasculaires cérébraux

Les études neuropsychologiques menées chez des patients diabétiques ont donc constaté des déficits de performance variable sur un large éventail de tests cognitifs. Des problèmes d'apprentissage, de mémorisation, de résolution de problème et de rapidité motrice ont été observés (Bale, 1973 ; Cox & Gonder Frederick, 1992 ; Deary, Crawford, Hepburn, Langan, Blackmore, & Fier, 1993 ; Mooradian, Perryman, Fitten, Kavonian, & Morley, 1988 ; Richardson, 1990 ; Ryan, Williams, Orchard, & Finegold, 1992 ; Ryan, Williams, Finegold, & Orchard, 1993 ; Strachan, Deary, Ewing, & Frier, 1997 ; Tun, Nathan, & Perlmutter, 1990). Chez les enfants diabétiques présentant des troubles cognitifs, l'âge d'apparition de la pathologie semble être un facteur déterminant ; les enfants développant le diabète avant l'âge de 5 ans (Rovet, Ehrlich, & Hoppe, 1987 ; Ryan, 1988) et ceux fréquemment victimes d'épisodes hypoglycémiques ont plus de risques de présenter des déficits cognitifs (Golden, Ingersoll, Brack, Russell, Wright, & Huberty, 1989 ; Rovet et al., 1987 ; Rovet & Alvarez, 1997). Les habilités visuelles et spatiales peuvent aussi être affectées par des épisodes récurrents d'hypoglycémie asymptomatique (Draeos et al., 1995 ; Hoffman et al., 1989).

Chez les patients adultes, de légères mais détectables réductions dans les capacités mentales ont été rapportées à maintes reprises (Ryan, 1988). Des

déficits sévères peuvent survenir, mais seulement chez quelques patients. Les altérations observées lors de l'exécution des différentes tâches cognitives ont tendances à varier selon les études (Richardson et al., 1990). Cette variation peut être due à la nature indéfinissable des déficits cognitifs, aussi bien qu'à l'hétérogénéité des études de population. De plus, la fréquence des épisodes d'hypoglycémie et d'hyperglycémie chroniques peut varier entre les patients. Un mauvais contrôle de la glycémie peut entraîner des complications périphériques, lesquelles seraient reliées aux dysfonctions du SNC (Ryan et al., 1992). D'un autre côté, les traitements intensifs à l'insuline augmenteraient la fréquence des épisodes hypoglycémiques (DCCT research group, 1991 ; Reichard, Berglund, Britz, Levander, & Rosenqvist, 1991) et pourraient ainsi affecter le cerveau. En plus de ces problèmes cognitifs, les individus diabétiques semblent prédisposés à d'autres maladies comme par exemple la maladie d'Alzheimer (Messier & Gagnon, 1996) et les accidents vasculaires cérébraux (AVC) (Abbott, Donahue, MacMahon, Reed, & Yano, 1987 ; Barrett-Connor & Khaw, 1988 ; Bell, 1994 ; De Jong, 1997 ; Pulsinelli, Levy, Sigsbee, & Plum, 1983 ; Tuomilehto, Rastenyte, Jousilahti, Sarti, & Vartiainen, 1996). Lors d'un AVC, un dommage localisé se produit au cerveau à cause de la diminution du débit sanguin. Il y a donc réduction d'apports en oxygène et en glucose. Les conséquences peuvent être dramatiques (perte permanente de la conscience, paralysie, cécité et perte de la

parole), selon la région du cerveau touchée et la taille de la région affectée. Les gens diabétiques sont donc plus susceptibles d'avoir des dommages au cerveau lors de ces AVC (De Jong, 1977). Quant à la maladie d'Alzheimer, il s'agit d'un état neuropsychiatrique incurable dans lequel se produit une détérioration progressive des fonctions cognitives, habituellement accompagnée de troubles affectifs et comportementaux (Bear, Connors, & Paradiso, 1997).

1.2.2 Modèles animaux pour l'étude du diabète.

La majorité des connaissances relatives aux changements comportementaux et neurochimiques dans le cerveau de patients diabétiques est le plus souvent basée sur des résultats obtenus chez des rongeurs. Les modèles animaux reproduisant le diabète contribuent à la compréhension de la pathophysiologie et des effets du diabète sur le cerveau.

Différents modèles animaux peuvent être utilisés dans ces études. Il y a les rongeurs chez lesquels le diabète est induit chimiquement par une injection de streptozotocine ou d'alloxan. Cette injection détruit les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, sécréteurs de l'insuline. Il existe également des souris prédisposées génétiquement, les souris NOD/LtJ (non-obèses diabétiques) qui

reproduisent la majorité des effets du diabète insulino-dépendant sur l'humain (tableau 2). Les animaux traités à la streptozotocine sont fréquemment utilisés lors d'études de pathogénèses et au cours d'essais de traitements pour les neuropathies diabétiques périphériques (Biessels & Van Dam, 1997). Ils ont également été utilisés pour l'observation des déficits d'apprentissage et de mémoire, et ce par l'entremise du labyrinthe aquatique de Morris (Morris, Anderson, Lynch, & Baudry, 1986). Dans ce test, les rongeurs sont placés dans un bassin rempli d'eau laiteuse où l'on retrouve, à un endroit bien précis du bassin, une petite plate-forme à peine recouverte d'eau. Cette plate-forme permet à l'animal qui la trouve de se reposer et d'échapper à une nage forcée. Lors d'une première séance, l'animal nage au hasard dans tout le bassin avant de localiser la plate-forme. Toutefois, au cours des séances subséquentes, il apprend rapidement où se trouve la plate-forme (2-3 séances de nage) et la retrouve avec beaucoup plus de facilité. Cet exercice permet de démontrer les déficits d'apprentissage présents chez les rats ayant développé un diabète mellitus suite à un traitement à la streptozotocine (STZ), le temps écoulé pour retrouver la plate forme étant plus important, comparativement aux rats contrôles (Biessels et al., 1996). D'un point de vue complémentaire, les expériences de Biessels ont démontré que l'insuline peut renverser partiellement le déficit de plasticité synaptique observé chez des rats devenus diabétiques suite à une injection de STZ (Biessels et al., 1996 ;

Tableau 2

Effets du diabète insulino-dépendant sur l'organisme.

	Humain	Souris NOD
Perte de poids	Présent	Présent
Polydipsie (avoir toujours soif)	Présent	Présent
Polyurie	Présent	Présent
Hyperglycémie	> 15 mmol/l	20-30 mmol/l
Acidose métabolique	Commun	Moins sévère
Taux d'insuline	Très bas	Très bas
Issue sans traitement d'insuline	Mort	Mort
Prédominance sexuelle	Femme ≥ homme	Femelle > mâle

Biessels et al., 1998).

1.3. IMPACT DU DIABÈTE SUR LES ASPECTS NEUROCHIMIQUES DU CERVEAU.

Tel que mentionné précédemment, le diabète est susceptible d'engendrer divers troubles au cerveau. Évidemment, le cerveau contient une multitude de substances médiatrices reconnues pour contribuer à son bon fonctionnement. La section qui suit abordera les évidences expérimentales montrant les effets du diabète sur les différents systèmes de neurotransmetteurs. Les différents sous-types de récepteurs reconnus pour assurer leurs effets sont présentés dans le tableau 3.

1.3.1 Système catécholaminergique.

La tyrosine est le précurseur de trois neurotransmetteurs aminergiques ayant une structure chimique commune appelée noyau catéchol. Ces neurotransmetteurs sont regroupés sous un même terme : catécholamines. Dans cette catégorie se retrouve la dopamine, la noradrénaline et l'adrénaline (épinéphrine). D'un point de vue anatomique, les neurones catécholaminergiques se trouvent situés dans les régions du système nerveux impliquées dans la régulation du mouvement, de

Tableau 3
Pharmacologie de quelques sous-types de récepteurs pour les neurotransmetteurs.

<u>Neurotransmetteur</u>	<u>Sous-type de récepteur</u>	<u>Agoniste</u>	<u>Antagoniste</u>
Glutamate	• AMPA	• AMPA	• CNQX • NBQX
	• NMDA	• NMDA	• AP5 • Kétamine • MK-801
	• Kainate	• Kainate	• CNQX • NBQX
Acétylcholine	• Récepteur nicotinique	• Nicotine	• Curare • Bungarotoxine
	• Récepteur muscarinique	• Muscarine	• Atropine
Noradrénaline	• Récepteur α	• Phényléphrine	• Phénoxybenzamine
	• Récepteur β	• Isoprotérénol	• Propranolol (β_1)
Adrénaline	• Récepteur α (α_1 et α_2)	• Oxymetazoline (α_2)	• Imiloxan (α_2)
	• Récepteur β (β_1 à β_4)	• Procaterol (β_2)	• Bisoprolol (β_1)
Dopamine	• D1 à D5	• Bromocriptine (D2,D3) • Quinpirole (D2, D3, D4)	• MPTP • BMAA • Chlorpromazine
Sérotonine	• 5-HT ₁ à 5-HT ₇	• Sumatriptan	• Fluoxétine

Présentation des principaux neurotransmetteurs du cerveau ainsi que leurs principaux agonistes et antagonistes (NMDA ; N-méthyl-D-aspartate, AMPA ; α -amino-3-hydroxy-5 méthyl - 4 -isoxazole proprionate, CNQX ; 6 - cyano -7 - nitroquinoxaline-2,3-dione, NBQX ; 1,2,3,4-tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxobenzo benzoquinoxaline-7-sulpho namide, AP5 ; D -2- amino -5- phosphonopentanoate, MK- 801 ; 5- méthyl -10, 11- dihydro -5H-dibenzocyclohepten -5, 10- iminemaleate, MPTP ; 1- méthyl - 4 - phényl - 1, 2, 3, 6 tétra hydropyridine, BMAA ; β - N - méthyl - amino - L - alanine).

l'humeur, de l'attention et des fonctions végétatives (Bear et al., 1997).

Une investigation *postmortem* dans le cerveau humain a démontré que le diabète chez l'homme provoque une augmentation de dopamine et de noradrénaline (Lackovic, Salkovic, Kuci, & Relja, 1990). Cette observation est similaire à celle observée chez le rat. En effet, l'induction durable du diabète par l'alloxan ou la STZ chez les rats est accompagnée par une augmentation sélective de la concentration de noradrénaline et de la dopamine dans le cerveau (Bitar, koulu, Rapoport, & Linnoila, 1985 ; Chu, Lin, Shian, & Leu, 1986). Par contre, chez le rat aussi bien que chez l'humain, les changements biochimiques ne sont pas généralisés, mais apparentés à quelques domaines spécifiques du cerveau.

Bitar et ses collaborateurs (1985) ont retrouvé une augmentation de noradrénaline dans le thalamus, l'hypothalamus, la medulla, le mésencéphale et dans le pont, puis une augmentation de 40 % de dopamine dans le thalamus (Fig.1). De plus, plusieurs études ont démontré que la synthèse de dopamine est réduite au niveau des neurones nigrostriés de cerveau venant de rats diabétiques (Crandall, Gillis, & Fernstrom, 1981 ; Kwok & Juorio, 1986 ; Saller, 1984 ; Trulson, Jacoby, & Mackenzie, 1986). En ce qui a trait aux récepteurs associés à ces neurotransmetteurs, Trulson et Himmel (1983) ont observé une augmentation

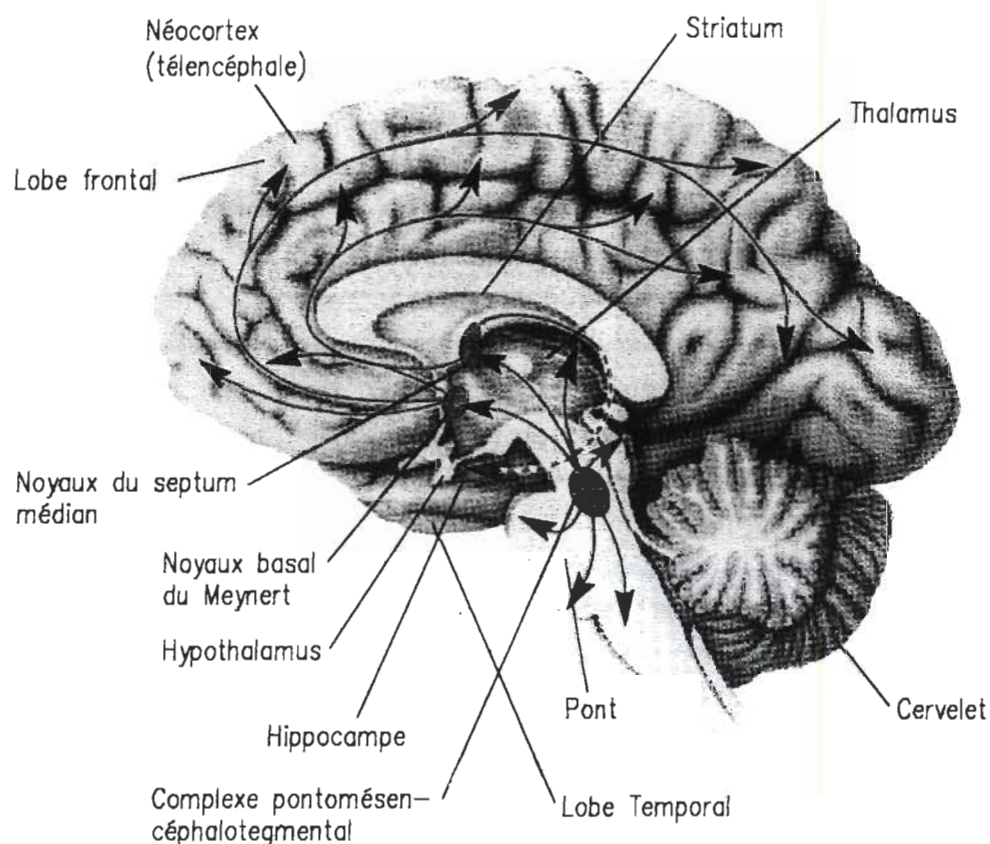


Figure 1. Principales composantes des systèmes cholinergiques centraux. Les noyaux du septum médian et le noyau basal de Meynert innervent très largement l'hippocampe et le cortex cérébral. Le complexe pontomésencéphalotegmental projette vers le thalamus et une partie du cerveau antérieur (tiré de Bear et al., 1997).

du nombre de récepteurs dopaminergiques dans le système limbique et le striatum de rats traités à la STZ. Pour leur part, Bitar et DeSouza (1990) ont noté une altération significative des récepteurs adrénergiques $\beta 1$ chez les rats traités à la STZ (tableau 3).

1.3.2 Système cholinergique.

Il existe des neurones cholinergiques au niveau du cerveau, dans le striatum et le cortex par exemple, où ils sont principalement présents sous forme d'interneurones. Toujours au niveau du cerveau, il existe deux systèmes cholinergiques modulateurs diffus majeurs : le complexe cholinergique pontomésencéphalotegmental et le complexe du cerveau antérieur basal (Fig.1). Pour ce dernier, le terme «complexe» est utilisé car les neurones cholinergiques sont disséminés dans plusieurs noyaux au cœur du télencéphale, dans la partie médiane et ventrale, par rapport aux ganglions de la base. Les plus connus sont les noyaux médians du septum qui envoient des fibres cholinergiques vers l'hippocampe et le noyau basal de Meynert qui est à l'origine de la plus grande partie de l'innervation cholinergique du néocortex (Fig.1). Le complexe de la base du cerveau pourrait aussi jouer un rôle particulier dans l'apprentissage et la mémorisation. Le second système cholinergique diffus, le complexe

cholinergique pontomésencéphalotegmental se compose de cellules du pont et du tegmentum mésencéphalique utilisant l'acétylcholine comme neurotransmetteur. Ce système influence principalement le thalamus dorsal, où, avec les systèmes noradrénergiques et sérotoninergiques, il régule l'excitabilité des relais sensoriels spécifiques. Ces cellules se projettent aussi vers le télencéphale, établissant ainsi un lien cholinergique entre le tronc cérébral et les complexes du cerveau antérieur basal (Bear et al., 1997) (Fig.1).

Plusieurs diabétiques présentant des problèmes de perte de mémoire à court terme, d'altération mnésique, des difficultés de concentration (Perlmutter et al., 1984 ; Ryan et al., 1985 ; Surridge et al., 1984), ainsi que des déficits cognitifs, démontrent une hypoactivité cholinergique (Bartus, Dean, Beer, & Lippa, 1982 ; Davis et al., 1983). Il est raisonnable de postuler que quelques-unes des conséquences comportementales du diabète sont dues au déficit dans la neurotransmission cholinergique. En effet, la synthèse et la relâche d'acétylcholine s'avèrent être réduites dans le striatum de rats diabétiques traités à la STZ (Welsh & Wecker, 1991) et une altération du métabolisme de l'acétylcholine a été proposée pour contribuer au déficit cognitif observé dans le diabète (Mooradian, 1987). Nakashima et ses collaborateurs (1993) ont rapporté une diminution des récepteurs cholinergiques muscariniques (tableau 3) dans le

cerveau, suivant un traitement à la STZ. De plus, Mooradian (1987) a rapporté une diminution de 40% dans le transport de choline à travers la barrière hématoencéphalique après 9 semaines d'hyperglycémie non contrôlée chez les rats, et a émis l'hypothèse que cette diminution peut provenir d'un déficit dans la quantité de précurseurs disponibles pour la synthèse d'acétylcholine. Cependant, l'effet du diabète sur la synthèse d'acétylcholine par le cerveau n'est pas complètement élucidé.

1.3.3 Système sérotoninergique.

La sérotonine est une monoamine, appelée aussi 5-hydroxytryptamine ; en abrégé : 5-HT (tableau 3). Elle est dérivée d'un acide aminé, le tryptophane. Il y a relativement peu de neurones sérotoninergiques dans le cerveau, mais ils sembleraient jouer un rôle tout à fait déterminant dans les systèmes cérébraux qui régulent l'humeur, l'émotivité ou encore le sommeil (Bear et al., 1997). La synthèse de la sérotonine est limitée par la quantité de tryptophane disponible dans le milieu extracellulaire baignant les neurones. La source principale du tryptophane cérébral est le sang, alors que le tryptophane sanguin provient de l'alimentation. Par conséquent, un déficit alimentaire en tryptophane mène rapidement à une diminution de sérotonine dans le cerveau (Bear et al., 1997).

L'induction du diabète par l'alloxan ou la STZ chez les rats est accompagnée d'une augmentation de la concentration de sérotonine dans le cerveau. En effet, Bitar et ses collaborateurs (1985) ont observé un accroissement de 35 % de sérotonine dans le cortex des rats traités à la STZ. De plus, cette augmentation de la concentration de sérotonine a été trouvée aussi bien chez les rats diabétiques (Bitar et al., 1985) que chez l'humain (Lackovic & Salkovic, 1990). Cependant, plusieurs études ont démontré que la synthèse de sérotonine diminue dans les neurones raphestriales du cerveau de rats diabétiques (Crandall et al., 1981 ; Kwok & Juorio, 1986 ; Saller, 1984 ; Trulson et al., 1986).

Une augmentation du taux de sérotonine, une diminution dans le contenu de ses métabolites ainsi qu'une altération dans la densité des récepteurs sérotoninergiques ont été rapportées dans le cerveau d'animaux diabétiques (Crandall et al., 1981 ; Kolta, Soliman, & Williams, 1986 ; Lackovic et al., 1990 ; Trulson et al., 1986).

1.3.4 Système glutamatergique.

Initialement, on a constaté que le glutamate avait une action dépolarisante sur certains neurones (Curtis, Phillis, & Watkins, 1961), et il fut ultérieurement

reconnu comme étant le principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux central des vertébrés (Mayer & Westbrook, 1987). La synthèse du glutamate se fait à partir de différents précurseurs, dont le glucose, et ce, grâce à des enzymes présentes dans toutes les cellules (Bear et al., 1997). Il est relargué par environ 40 % des synapses du système nerveux central (Fonnum et al., 1984).

L'activité dépolarisante du glutamate est couplée à des récepteurs classés selon leurs propriétés pharmacologiques et électrophysiologiques : les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) et non-NMDA. Dans cette dernière catégorie, on retrouve 2 sous-types: les récepteurs AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate) et les récepteurs kaïnate (tableau 3). Chacun a une affinité sélective pour leurs agonistes glutamatergiques et possède des caractéristiques pharmacologiques précises (Dingledine, Borges, Bowie, & Traynelis, 1999 ; Watkins, Krogsgaard-Larsen, & Honore, 1990).

La distribution des récepteurs AMPA est ubiquitaire au niveau du système nerveux central avec des différences de densités régionales. Ils sont responsables de la neurotransmission excitatrice rapide, au niveau fonctionnel, dans la plupart des synapses du système nerveux central, en plus d'assurer à eux seuls la majorité des réponses excitatrices de types glutamatergiques dans le cerveau (Mayer &

Westbrook, 1987). La stimulation du récepteur AMPA, par l'entremise d'un agoniste, induit une entrée importante de sodium dans la cellule accompagnée d'une sortie équivalente d'ions potassium ; un courant calcique à travers ce récepteur est présent mais il est négligeable par rapport à celui survenant lors de l'activation du récepteur NMDA (Fig.2) (Burnashev, Zhou, Neher, & Sakmann, 1995 ; Keller, Hollman, Heineman, & Konnerth, 1992).

Les récepteurs AMPA et NMDA sont généralement activés durant une transmission synaptique mais contrairement aux récepteurs AMPA, les récepteurs NMDA médient une neurotransmission excitatrice plus lente et de durée plus longue, due à leur cinétique (Dingledine et al., 1999 ; McBain & Mayer, 1994). Moriyoshi et ses collaborateurs (1991) ont décrit et confirmé trois des plus importantes caractéristiques des récepteurs NMDA : 1) le canal du récepteur est obstrué par des ions magnésium, dont la libération est dépendante du potentiel membranaire (Fig.2) ; 2) la glycine agit comme co-agoniste du glutamate puisqu'elle est nécessaire pour l'ouverture efficace du canal ; 3) le canal est perméable aux ions calcium et à d'autres cations divalents (Fig.2). Ainsi, l'activation des récepteurs NMDA nécessite à la fois la liaison du glutamate et une dépolarisation membranaire suffisante, généralement fournie par l'activation préalable des récepteurs AMPA et kaïnate.

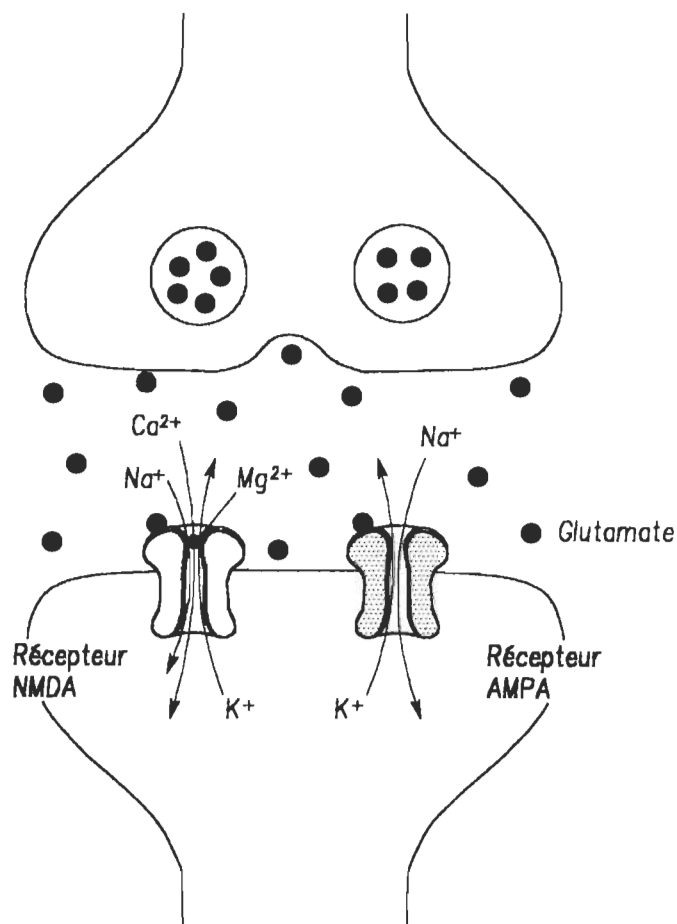


Figure 2. Aspect pharmacologique de la transmission synaptique assurée par le neurotransmetteur glutamate. L'arrivée de l'influx nerveux au niveau de la terminaison nerveuse déclenche la libération de glutamate. De plus, l'entrée de Na^{+} à partir des récepteurs AMPA et de Na^{+} et de Ca^{2+} à partir des récepteurs NMDA déclenche un PPSE.

De nombreuses études ont montré que les récepteurs glutamatergiques doivent être modifiés lors du stockage de l'information. Cependant, en ce qui concerne les changements touchant les récepteurs glutamatergiques, tant au niveau électrophysiologique que biochimique dans le diabète, les données sont à peu près inexistantes. Gagné et ses collaborateurs (1997) ont vu, chez les rats souffrant de diabète chronique, une réduction de la liaison du ^3H -AMPA, ce qui ne semble pas être dû à une perte majeure de neurones. Les modifications produites par le diabète sembleraient être spécifiques seulement pour le récepteur AMPA, étant donné que la liaison du ^3H -glutamate au complexe de récepteurs NMDA n'est pas affectée. De plus, cette réduction dans l'affinité de la liaison du ^3H -AMPA suggère que le diabète, induit par l'administration de STZ, change la conformation mais pas le nombre de sites des récepteurs AMPA (Gagné et al., 1997). Par ailleurs, lors du diabète précoce, il semble également que les récepteurs au glutamate soient altérés dans le système nerveux central. Ainsi, il a été rapporté que les récepteurs de type AMPA et NMDA étaient régulés à la hausse de manière précoce dans la moelle épinière d'animaux diabétiques de type 2 (Li, Young, Bailey, & Smith, 1999). Il semble également que l'expression des récepteurs NMDA est plus importante dans les cerveaux de souris prédisposées génétiquement au DID (NOD/LtJ) (Valastro, Girard, & Massicotte, 2000). L'impact fonctionnel de ces changements biochimiques identifiés dans la phase

précoce du diabète demeure inconnu. Or, nos travaux sur la réponse de l'hippocampe des souris NOD permettront de mieux comprendre les interactions fonctionnelles entre le développement du diabète et la régulation des récepteurs au glutamate.

De nos jours, il est reconnu que le système glutamatergique est impliqué dans plusieurs phénomènes et fonctions cérébrales, tels la plasticité neuronale, la mémoire et l'apprentissage, mais aussi dans la physiopathologie de diverses affections neurologiques aiguës et chroniques (Cattabeni, Gardoni, & Di Luca, 1999). Entre autre, l'importance du glutamate et de ses récepteurs est maintenant reconnue dans le développement de la potentialisation à long terme (ou LTP) de la transmission neuronale, un modèle électrophysiologique de mémorisation (qui sera décrit ultérieurement). Par ailleurs, l'activation des récepteurs glutamatergiques est mise à contribution dans les processus normaux de synaptogenèse et d'élimination des neurones surnuméraires lors du développement du cerveau (Bear et al., 1997). D'un point de vue pathologique, on reconnaît aux récepteurs glutamatergiques des actions neurotoxiques dépendantes du calcium et ce, au cours de conditions neurodégénératives comme lors d'un AVC. Une contribution des récepteurs au glutamate dans la neurodégénérescence de type Alzheimer et chez les patients souffrant de la

Chorée d'Huntington a aussi été proposée (Doble, 1995). Des études récentes ont montré que la régulation précoce des récepteurs glutamatergiques lors du diabète pourrait être associée au développement des neuropathies périphériques. Le tableau 4 résume l'ensemble des effets physiopathologiques liés à la stimulation des récepteurs glutamatergiques.

1.3.4.1 Potentialisation synaptique à long terme.

La potentialisation synaptique à long terme (LTP) a été décrite initialement au niveau de l'hippocampe par Bliss et Lomo (1973). Elle fut d'abord démontrée au niveau des synapses de la voie perforante sur les neurones du gyrus dentelé mais a été également retrouvée au niveau de nombreuses autres synapses du système nerveux central de mammifères. Aujourd'hui, la plupart des expériences utilisent les synapses des collatérales de Schaffer sur les neurones pyramidaux du champ CA₁ (Fig.3A) (Bear et al., 1997). Dans lesquelles la pente des enveloppes de PPSE est considérée comme mesure de l'activité fonctionnelle des neurones glutamatergiques. La LTP représente un renforcement de l'efficacité à transmettre l'information entre deux neurones, suivant l'application d'une stimulation tétanique. Elle concerne donc le renforcement d'une réponse synaptique durant une stimulation répétée.

Tableau 4

Effets physiopathologiques des récepteurs glutamatergiques

Implications physiologiques	Implications pathologiques
<ul style="list-style-type: none">- Développement de la LTP- Plasticité neuronale- Apprentissage- Mémoire- Synaptogenèse- Élimination des neurones surnuméraires lors du développement du cerveau.	<ul style="list-style-type: none">- Neurotoxicité lors des conditions neurodégénératives<ul style="list-style-type: none">- AVC- Alzheimer- Chorée d'Huntington

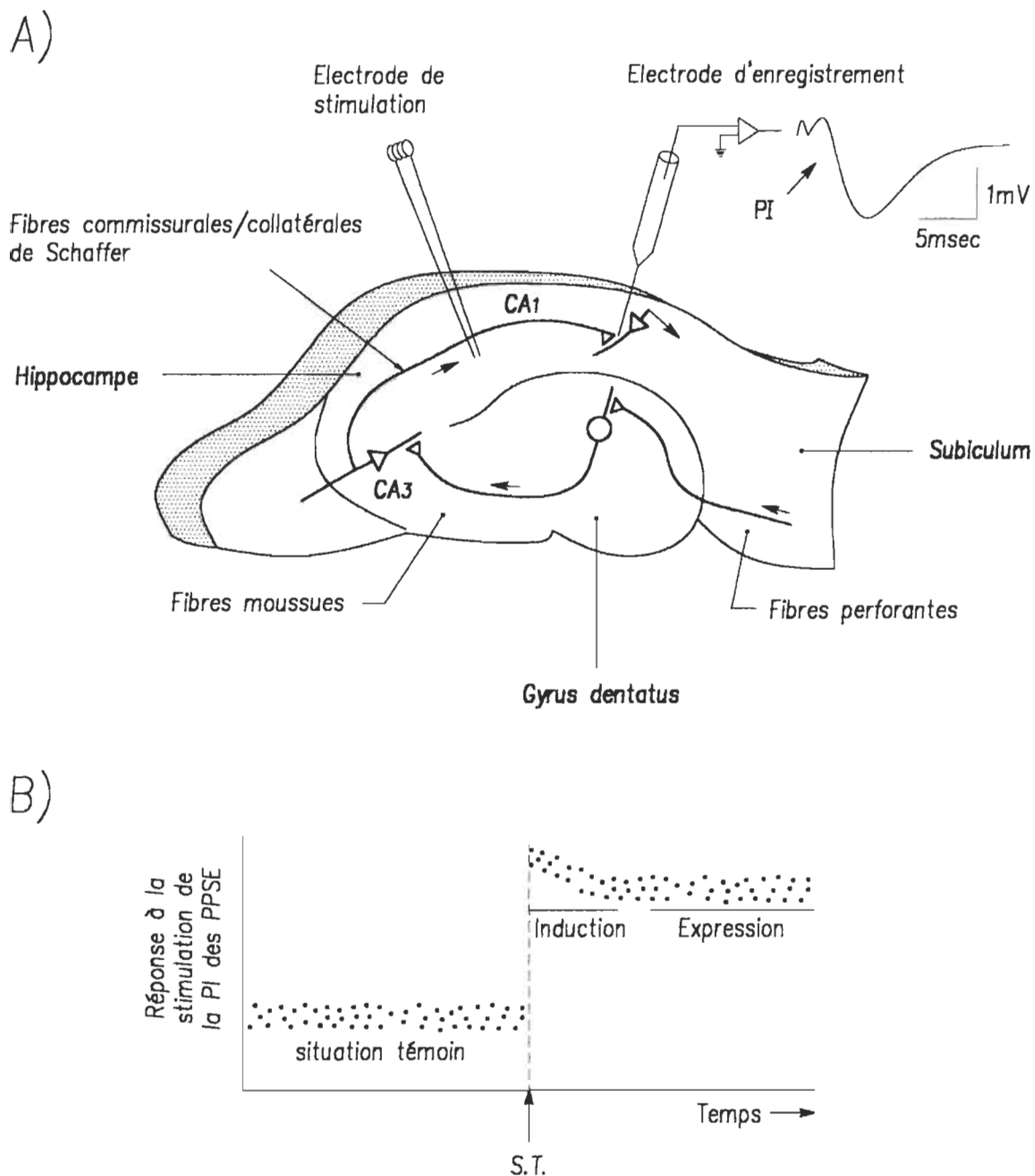


Figure 3. Représentation schématique de l'approche expérimentale pour l'analyse électrophysiologique de la structure hippocampale. A) La pente (PI) des enveloppes de PPSE est considérée comme mesure de l'activité fonctionnelle des neurones glutamatergiques de la région CA₁ dans les tranches d'hippocampe. B) Le diagramme illustre l'évolution de l'amplitude des PPSE après une stimulation tétanique (ST).

La potentialisation à long terme de la transmission synaptique des neurones glutamatergiques peut être reproduite électrophysiologiquement par des stimulations électriques appropriées. Une équipe de chercheurs a démontré que le patron de stimulation idéal pour induire la LTP dans l'hippocampe doit contenir dix trains de haute fréquence de quatre pulsations à 100 Hz répétés à un intervalle de temps de 200 msec (ou 5 Hz) (Larson, Wong, & Lynch, 1986). Or, ce modèle de stimulation électrique ressemble fortement à celui produit, de façon naturelle, par les neurones de l'hippocampe d'un animal en situation d'apprentissage (Bland, 1986 ; Steriade, Gloor, Llinas, Lopes da Silva, & Mesulam, 1990). En fait, ces paramètres de stimulation sont largement reconnus et utilisés pour induire le phénomène de LTP au niveau expérimental (Aihara, Tsukada, Crair, & Shinomoto, 1997).

Tel que présenté en figure 3B, d'un point de vue séquentiel, la LTP est divisée en deux phases : la phase d'induction, qui commence après la stimulation téτανique et dure environ dix minutes, suivi de la phase d'expression et de maintien, qui peut durer plusieurs heures dans des préparations *in vitro*.

Lors d'une stimulation électrique simple, la stimulation des récepteurs AMPA sera principalement responsable de la réponse synaptique de base dans

l'hippocampe ; les récepteurs NMDA n'étant pas sollicités lors de cette transmission neuronale puisqu'ils sont bloqués par le magnésium (Fig.2). Néanmoins, différentes études ont démontré que l'activation des récepteurs NMDA constitue l'étape cruciale pour induire la LTP dans l'hippocampe (Dudek & Bear, 1992 ; Larson & Lynch, 1988). En ce sens, il fut observé que l'AP5, un antagoniste du récepteur NMDA, prévient la formation des formes de neuroplasticités sans modifier la formation des potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSE) par les récepteurs AMPA (Svendsen, Tjolsen, & Hole, 1998 ; Svendsen, Tjolsen, Rygh, & Hole, 1999). L'ouverture des récepteurs NMDA semble donc essentielle à l'instauration de la LTP.

L'induction de la LTP dans le champ CA₁ de l'hippocampe requiert donc l'activation postsynaptique du récepteur NMDA, un influx calcique à travers le canal NMDA et l'activation subséquente de nombreux seconds messagers et de protéines kinases (Bliss & Collingridge, 1993 ; Malenka, 1994).

Lors de l'induction, l'application d'une stimulation de haute fréquence (SHF) entraînera une libération abondante de glutamate dans la fente synaptique, lequel, en se fixant sur de nombreux récepteurs non-NMDA, dépolarisera suffisamment la membrane postsynaptique. Cette importante dépolarisation permettra de lever

l'inhibition causée par les ions magnésium présents sur les récepteurs NMDA. Bien que peu nombreux à être activés, ces récepteurs NMDA vont contribuer à dépolariser davantage la membrane postsynaptique et faciliteront l'ouverture de récepteurs NMDA additionnels. C'est donc ce phénomène en cascade qui assurerait l'induction de la LTP. Néanmoins, la capacité d'activer le récepteur NMDA serait différente selon l'intensité de la stimulation électrique appliquée. En effet, l'excitation des récepteurs NMDA surviendrait de façon importante lors d'une SHF (Artola, Broecher, & Singer, 1990 ; Coomber, 1997 ; Malenka, 1994). En résumé, la stimulation tétanique provoquera l'ouverture d'un grand nombre d'unités réceptrices NMDA ce qui permettrait une entrée importante de calcium dans l'élément postsynaptique. Par conséquent, c'est un équilibre différentiel dans la concentration de calcium présent dans l'élément postsynaptique qui induira la potentialisation.

Tel que mentionné auparavant, la potentialisation à long terme de la transmission synaptique des neurones glutamatergiques peut être reproduite électrophysiologiquement par des stimulations électriques appropriées. De plus, l'utilisation de modèles animaux reproduisant le diabète peut contribuer à la compréhension de pathophysiologie et des effets du diabète sur le cerveau humain. Deux groupes différents ont observé que l'expression de la LTP, dans le

champ CA_1 de l'hippocampe, de rats traités à la STZ était affaiblie chez les rats sévèrement hyperglycémiques par rapport aux rats témoins non-diabétiques (Biessels et al., 1996 ; Chabot, Massicotte, Milot, Trudeau, & Gagné, 1997). Les mécanismes précis sous jacents à l'apparition des déficits en LTP lors du diabète demeurent inconnus. Ces déficits pourraient éventuellement découler d'une altération spécifique des processus d'induction et/ou d'expression de la LTP dans des régions limitées du cerveau. Il se pourrait, par ailleurs, que les dommages à la LTP ne soient qu'une conséquence indirecte de la détérioration généralisée de l'ensemble du cerveau chez les sujets soumis à un diabète chronique.

1.4. STRESS OXYDATIF ET LE DIABÈTE.

Au cours des dernières années, l'intérêt pour les dérivés actifs de l'oxygène n'a cessé de croître étant donné leurs implications potentielles dans un grand nombre de désordres neuropathologiques à caractère neurodégénératif, comme les accidents vasculaires cérébraux (Gutteridge, 1993), la démence de type Alzheimer et la maladie de Parkinson (Martinovits, Melamed, Cohen, Rosenthal, & Uzzan, 1986 ; Subbarao, Richardson, & Ang, 1990). En effet, on a pu démontrer une association, du moins partielle, de ces maladies à des conditions de stress oxydatif (Chan, 1996 ; Congy, Bonnefont-Rousselot, Dever, & Emerit,

1995 ; Subbarao et al., 1990). Plusieurs des réactions chimiques associées aux états de stress oxydatif semblent résulter du métabolisme de l'oxygène, particulièrement élevé dans les cellules nerveuses. Les substances radicalaires provenant de l'utilisation de l'oxygène sont principalement : l'ion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 ; source de $HO\bullet$), les radicaux peroxy (ROO^{\bullet}) et les radicaux hydroxyles (OH^{\bullet}). L'oxydation des protéines et des lipides (peroxydation lipidique) sont deux conséquences graves de la production excessive des dérivés actifs de l'oxygène (Di Simplicio et al., 1995 ; Kakkar, Karla, Mantha, & Prasad, 1995 ; Mak et al., 1996 ; Pereira, Moreira, Seica, Santos, & Oliveira, 2000 ; Toleikis & Godin, 1995). Selon la théorie d'Harman (Harman, 1956 ; Harman, 1981), les agressions oxydantes successives, se produisant lors du vieillissement, créent des conditions de déséquilibre favorisant l'action des agents pro-oxydants (Pacifici & Davies, 1991).

Une fois ces agents activés, de nombreuses modifications moléculaires peuvent s'ensuivre, notamment au niveau des lipides membranaires poly-insaturés, des protéines et des acides nucléiques (Pacifici & Davies, 1991). Par exemple, avec l'âge, les mécanismes de défense cellulaire deviendraient moins efficaces et ce, dû à l'inactivation des nombreuses enzymes antioxydantes (Crastes & Paulet, 1990). Une production accrue de radicaux réactifs d'oxygène

est toxique pour les cellules, particulièrement pour la membrane cellulaire dans laquelle ces radicaux interagissent avec la bicouche lipidique pour produire des peroxydes lipidiques (Haugaard, 1968). En ce qui a trait à la distribution des enzymes antioxydantes, elles sont particulièrement faibles au niveau du cerveau comparativement aux autres tissus de l'organisme (Zhang, Maiorino, Roveri, & Ursini, 1989). Ceci confère à cette structure une susceptibilité particulière aux dérivés actifs de l'oxygène. Le système nerveux central est donc particulièrement vulnérable au stress oxydatif.

Le diabète mellitus pourrait également être associé à l'augmentation du stress oxydatif. Dans le diabète, l'augmentation de la concentration de glucose et des acides gras libres peut stimuler les cellules endothéliales et les macrophages à sécréter du monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) et des ions superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), résultant en une formation accrue de peroxynitrite et de peroxydation lipidique (Semenkovich & Heinecke, 1997 ; Traub & Van Bibber, 1995). Cette augmentation de peroxydation lipidique associée au diabète est due à une altération intracellulaire du ratio entre les dérivés actifs de l'oxygène et le système antioxydant (Altomare, Vendemiale, Chicco, Procacci, & Cirelli, 1992 ; Altomare et al., 1995). Ainsi, une augmentation aiguë dans les niveaux de glucose peut réduire les défenses naturelles antioxydantes (Crouch, Kimsey, Priest, Sarda, & Buse, 1978 ;

Matkovics, Varga, Szabo, & Witas, 1982).

De nombreuses études ont montré que la peroxydation lipidique est augmentée dans le plasma et les tissus de sujets diabétiques. Sato et ses collaborateurs (1979) ont rapporté une augmentation des produits associés à la peroxydation lipidique dans le plasma de patients diabétiques (Sato, Hotta, & Sakamoto, 1979 ; Giugliano, Ceriello, & Paolisso, 1996). Gallou et ses collaborateurs (1993) ont confirmé une augmentation de la peroxydation lipidique chez les patients diabétiques en mesurant les composés réactifs de l'acide thiobarbiturique. Une augmentation de la peroxydation lipidique a été également rapportée chez les modèles diabétiques induit par la STZ ou l'hyperglycémie résultant d'insulinopénie (Takasu, Komiya, Asawa, Nagasawa, & Yamada, 1991).

Le stress oxydatif présent dans l'état diabétique serait associé au développement des complications à long terme du diabète (Baynes, 1991). Katoh (1992) a démontré le lien entre la peroxydation lipidique et le diabète en plus de postuler sur le rôle des espèces d'oxygène dans le développement des complications à long terme du diabète grâce à la mesure du peroxyde lipidique dans le sérum. Dandona et ses collaborateurs (1996) ont montré les dommages oxydatifs fait à l'ADN suite à une génération accrue des espèces d'oxygène

réactives chez les patients avec le diabète mellitus, lesquelles peuvent être un facteur qui accélère le vieillissement et la microangiopathie diabétique. Pieper et ses collaborateurs (1995) ont conclu que le peroxyde d'hydrogène est directement impliqué dans les dommages aux tissus diabétiques (Pieper, Jordan, Dondlinger, Adams, & Roza, 1995). La peroxydation lipidique résultant de la dégradation oxydative d'acides gras polyinsaturés de la membrane cellulaire peut endommager les tissus et finalement causer différentes complications au modèle diabétique (Garner, 1989 ; Godin, Wohaieb, Garnett, & Goumeniouk, 1988 ; Porter, 1984 ; Sato et al., 1979). D'autres études ont suggéré l'existence d'une peroxydation lipidique anormale chez les patients diabétiques (Haffner, Agil, Mykkanen, Stern, & Jialal, 1995 ; Jos et al., 1990) et la possibilité que les dérivés actifs de l'oxygène jouent un rôle dans le développement de dysfonctions artérielles dans le diabète (Ceriello, Quatraro, Caretta, Varano, & Giugliano, 1990). De plus, la peroxydation lipidique présente dans les lipoprotéines du plasma et dans les membranes cellulaires, semblant refléter l'augmentation de stress oxydatif dans le diabète, peut contribuer au développement de maladie vasculaire (Bauduceau et al., 1996 ; Baynes, 1991 ; Dunn, 1992 ; Semenkovich & Heinecke, 1997 ; Taupin et al., 1993) ; la principale cause de morbidité et de mortalité chez les patients diabétiques (Giugliano et al., 1996). Par conséquent, la réduction du stress oxydatif pourrait réduire les complications à long terme du

diabète.

1.4.1. Influence du Ca^{2+} sur les récepteurs NMDA : impact sur le stress oxydatif.

Outre le métabolisme basal de l'oxygène, le calcium a une capacité importante de production de dérivés actifs de l'oxygène. En effet, une autre source importante de formation de radicaux libres découle de l'activation par l'ion calcium de divers mécanismes enzymatiques endogènes (Halliwell, 1992 ; Luft, 1994). Par exemple, lorsque la concentration intracellulaire de calcium s'accroît, un grand nombre d'enzymes, telles les protéases, les synthases et les phospholipases, peuvent voir leur activité augmentée, favorisant ainsi la formation des dérivés actifs de l'oxygène (Coyle & Puttfarcken, 1993 ; Siesjo, 1988 ; Siesjo et al., 1995). Une de ces enzymes, la calpaine, peut activer la xanthine oxydase, laquelle produit des radicaux superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Fig. 4) (Fridovich, 1970 ; Musley, Bruce, Malfroy, & Baudry, 1994). D'autre part, la NO synthase (NOS) transforme l'arginine présente dans le milieu intracellulaire en NO^{\bullet} (monoxyde d'azote) (Luft et al., 1994). De plus, une autre enzyme, la phospholipase A_2 (PLA_2), active le métabolisme de l'acide arachidonique. Celui-ci, par l'action de diverses enzymes

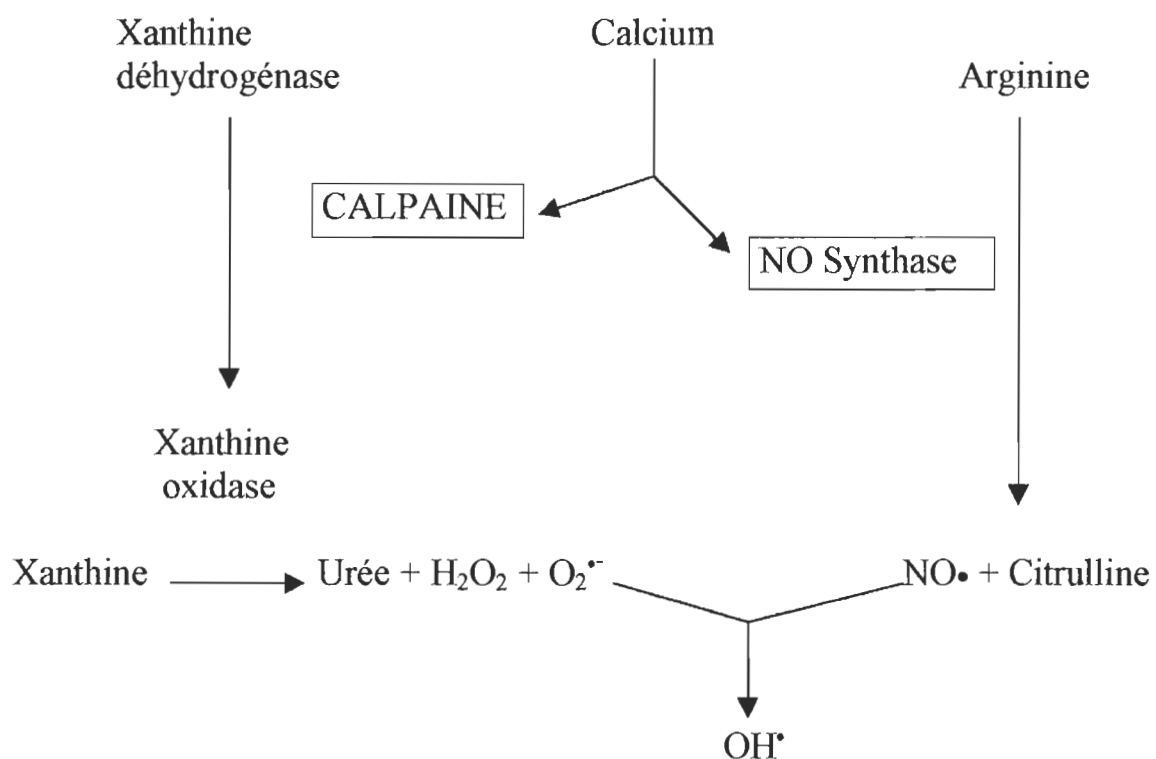


Figure 4. Rôle de la calpain et de la NO synthase dans la production de radicaux libres.

telles les lipoxygénases et les cyclooxygénases, engendre la formation excessive d'endoperoxydes, lesquels possèdent un effet similaire aux dérivés actifs de l'oxygène (Ohtsuki & Kamada, 1995). Enfin, les métaux de transition sont des éléments clés de la genèse des dérivés actifs de l'oxygène (Aust, Morehouse, & Thomas, 1985). Les ions métalliques libres sont de puissants catalyseurs dans la plupart des réactions de production des dérivés actifs de l'oxygène (Haber & Weiss, 1934). Le maintien d'un taux minimal d'ions métalliques libres apparaît vraisemblablement crucial pour le bon fonctionnement de tout organisme.

Des études ont clairement démontré que l'influx de calcium, qui survient lors d'une activation soutenue des récepteurs NMDA, contribue à la production des dérivés actifs de l'oxygène, en particulier le radical superoxyde (Lafon-Cazal, Pietri, Culcasi, & Bockarert, 1993). Selon plusieurs neurobiologistes, c'est fort probablement la stimulation des récepteurs NMDA, suivie de l'entrée de calcium qui en résulte, et finalement la production des dérivés actifs de l'oxygène, qui assureraient la mort des neurones lors des AVC (Doble, 1995 ; Lafon-Cazal et al., 1993 ; Siesjo, 1989 ; Siesjo, Bengtsson, Grampp, & Theander, 1989). En effet, une production des dérivés actifs de l'oxygène a été directement mise en évidence lors de ce type d'affection cérébrale. De plus, les dommages cérébraux induits lors d'un AVC semblent être largement diminués par l'administration

d'antagonistes glutamatergiques de type NMDA.

Fait intéressant, il a été démontré que l'apparition du diabète, chez des souris prédisposées génétiquement à cette affection, est associée à une hausse importante des niveaux d'expressions des récepteurs NMDA (Valastro et al., 2000). Cette hausse est observée dans diverses régions reconnues pour être susceptibles à la mort des neurones lors d'un AVC, notamment dans la région hippocampale. Or, tout porte à croire que le diabète serait une condition susceptible d'encourager la neurotoxicité induite par le récepteur NMDA.

1.5 OBJECTIFS DE LA RECHERCHE.

1.5.1 Objectifs spécifiques.

Des études électrophysiologiques sont donc proposées dans le but d'évaluer l'impact du diabète sur la transmission synaptique des neurones glutamatergiques de l'hippocampe. Spécifiquement, nous espérons atteindre cet objectif général en tentant de répondre à trois questions:

1- Est-ce que les réponses excitatrices assurées par les récepteurs de type NMDA et AMPA sont altérées dans la région CA₁ de l'hippocampe chez les souris prédisposées génétiquement au diabète?

Deux types de récepteurs glutamatergiques sont habituellement impliqués dans les phénomènes de transmission neuronale. En effet, des études prenant avantage de l'utilisation d'antagonistes spécifiques, comme l'AP-5 et le CNQX, ont grandement contribué aux connaissances actuelles de la fonction des récepteurs glutamatergiques. Il est reconnu, par exemple, que l'activation des récepteurs glutamatergiques de type AMPA est nécessaire pour la production de la majorité des réponses excitatrices rapides assurées par le glutamate. En ce qui a trait au récepteur de type NMDA, sa contribution dans les processus de transmission synaptique est normalement requise lors de stimulations intenses des neurones.

Man et ses collaborateurs (2000) ont récemment démontré que l'insuline peut, sur des neurones en culture, atténuer de manière spécifique les réponses excitatrices générées par les récepteurs AMPA. Qu'en est-il du diabète? Dans cette optique, des expériences ont été réalisées afin d'évaluer les réponses excitatrices assurées par les récepteurs de types NMDA et AMPA et ce, chez l'animal génétiquement prédisposé au diabète. De manière concrète, nous

comptons effectuer l'analyse des réponses glutamatergiques (NMDA et AMPA) dans la région CA₁ de l'hippocampe. L'intérêt pour cette région du cerveau découle principalement des observations cliniques démontrant la grande vulnérabilité de cette portion du cerveau lors de divers traumatismes.

2- Est-ce que le diabète affecte les processus de plasticité neuronale?

Il est à noter que l'activation des récepteurs glutamatergiques s'avère cruciale pour la formation des phénomènes de plasticité neuronale, dont la LTP. Comme il a été mentionné précédemment, la LTP constitue fort probablement un mécanisme fondamental de renforcement neuronal qui surviendrait lors du stockage de nouvelles informations. Dans le cas de la région CA₁ de l'hippocampe, l'activation des récepteurs NMDA semble constituer l'étape cruciale de l'induction de la LTP. Toutefois, beaucoup d'études ont démontré que la régulation à la hausse des récepteurs AMPA représente l'un des mécanismes essentiels au maintien de ce phénomène de plasticité neuronale. Est-ce que le développement de cette importante fonction physiologique qu'est la LTP se voit modifié lors du diabète, compte tenu des altérations biochimiques apportées aux récepteurs glutamatergiques dans cette affection? Des études portant sur les

caractéristiques d'induction et de maintien de la LTP chez l'animal diabétique ont évidemment été exécutées.

3- Est-ce que le diabète modifie la vulnérabilité des neurones glutamatergiques lors d'un traumatisme hypoxique?

Les effets délétères de l'hypoxie sur la fonction des neurones sont bien connus. À l'échelle *in vitro*, les analyses électrophysiologiques, utilisant des tranches d'hippocampes, ont révélé qu'une réduction irréversible de la transmission synaptique peut survenir dans la région CA₁ de l'hippocampe suite à une période transitoire d'hypoxie (Li et al., 1998 ; Reagan et al., 2000). Sur le plan neurochimique, l'activation des récepteurs glutamatergiques lors du traumatisme hypoxique apparaît comme une étape cruciale conduisant à la détérioration de la fonction neuronale. Compte tenu de la présence de changements biochimiques des récepteurs glutamatergiques chez l'animal diabétique, on pourrait s'attendre à ce que la récupération des réponses synaptiques, suite à l'hypoxie, puisse être affectée. Nous avons évidemment pris avantage de notre expertise en électrophysiologie pour vérifier cette possibilité.

1.5.2 Importance et originalité de la recherche.

Nous souhaitons, par l'ensemble de ces travaux, établir le rôle des récepteurs glutamatergiques dans le développement des affections neurologiques associées au diabète mellitus. Dans une perspective élargie, les retombées potentielles de nos travaux pourront contribuer à la compréhension des processus neurodégénératifs en général, notamment lors de la maladie d'Alzheimer et au cours des accidents vasculaires cérébraux ; deux affections dont l'incidence est accrue chez les sujets diabétiques (Abbott et al., 1987 ; Barrett-Connor & Khaw, 1988 ; Messier & Gagnon, 1996) .

MATÉRIEL ET MÉTHODES

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 PRÉPARATION DU TISSU CÉRÉBRAL.

Des souris femelles, dont 60 NON/LtJ (non-diabétiques non-obèses ; contrôles) et 60 NOD/LtJ (diabétiques non-obèses), âgées d'environ 1 mois et demi, obtenues chez Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine), ont été placées sous un cycle jour/nuit de 12 heures, la nourriture et l'eau fournies à volonté. La souris NOD/LtJ est un modèle animal de DID fréquemment utilisé pour l'étude du diabète de type 1 et de ces complications (Hanafusa et al., 1994). Chez ce modèle, la pathologie apparaît au cours des 3 à 5 premiers mois de vie et moins de 10 gènes sont responsables de son développement. L'état diabétique est le résultat de la destruction des cellules bêta du pancréas par les lymphocytes T du système immunitaire (Hanafusa et coll., 1994). Par conséquent, le taux de sucre dans le sang (glycémie) des souris, tant contrôles que diabétiques, était vérifié quotidiennement de façon indirecte par un test urinaire utilisant des languettes de dosage conçues à cet effet (Chemstrip® uG/K ; Boehringer Mannheim). Lorsqu'une souris NOD était déclarée glycosurique, une souris contrôle de même âge était sélectionnée, et nous procédions, dès le lendemain après-midi, à leur

sacrifice par décapitation. Toutefois, dans certaines expériences, les souris NOD déclarées diabétiques subissaient un traitement d'une semaine à l'insuline avant d'être sacrifiées (1,2% d'insuline bovine (0,4% Zn), 98,8% microrecrystallisée et de l'acide palmitique). Le médicament fut administré à l'aide d'un implant sous-cutané (Linshin Canada, Inc.), contenant 13 ± 2 mg dont $\sim 0,1$ $\mu\text{g}/\text{jour}$ est absorbé par les souris avant d'être sacrifiées. Il y avait donc un diabète de courte durée puisque que les expérimentations étaient entreprises à partir du moment où une glycosurie était mesurée. Cependant, ceci peut signifier que le diabète était présent depuis plus longtemps, c'est-à-dire avant que la filtration rénale ne suffise plus à la tâche.

Lorsque prêtes à être utilisées, les souris étaient d'abord anesthésiées dans une atmosphère de méthoxyflurane (Métofan[®]; Janssen Pharmaceutica), puis sacrifiées par décapitation. Le sang des souris était immédiatement récupéré dans des tubes contenant de l'EDTA (Vacutainer Systems, Becton Dickinson), puis centrifugé pendant 3 minutes à 1000g. Cette centrifugation avait pour but de séparer le sérum des constituants cellulaires pour fin d'analyses sériques (dosage du glucose). Ces analyses furent réalisées à l'aide d'une trousse commerciale (glucose oxidase, Sigma, St-Louis, MO). Simultanément, leur cerveau était rapidement prélevé puis déposé dans une solution physiologique froide (4°C ;

contenant, en mM, NaCl 123, KCl 5, NaH_2PO_4 1.25, MgCl_2 1.5, CaCl_2 3.5, NaHCO_3 26 et glucose 10 ; solution de Krebs¹) afin de procéder immédiatement à la dissection de l'hippocampe d'un des hémisphères cérébraux sélectionné de façon aléatoire. L'hippocampe isolé était ensuite sectionné transversalement en tranches de 450 μm à l'aide d'un appareil de coupe (McIlwain Tissue Chopper). Les tranches d'hippocampe ainsi obtenues étaient par la suite déposées délicatement dans la chambre d'incubation d'une chambre électrophysiologique (Fig. 5). Toutefois, dans certaines des expériences, le gyrus dentelé et/ou la partie CA₃ étaient supprimés. Cette chambre d'incubation était remplie de solution de Krebs préalablement oxygénée par barbotage d'un mélange gazeux (Carbogène médical, 95% O₂ et 5% CO₂ ; Praxair) et maintenue à la température constante de 34,5°C. Selon les expériences effectuées, une solution de Krebs en condition statique (volume constant rajusté pour contrer l'évaporation) ou en perfusion (débit de 1 ml/min.) était utilisée.

De plus, pendant toute la durée de l'expérience, et ce, même 1 heure auparavant, la chambre électrophysiologique était oxygénée par ce même mélange gazeux (Carbogène médical) préalablement hydraté. Ce mélange gazeux

¹ Le terme «solution de Krebs» est largement utilisé dans la littérature et fait référence à toute solution physiologique contenant les éléments ci-haut mentionnés, mais dont les concentrations peuvent varier d'une étude à l'autre.

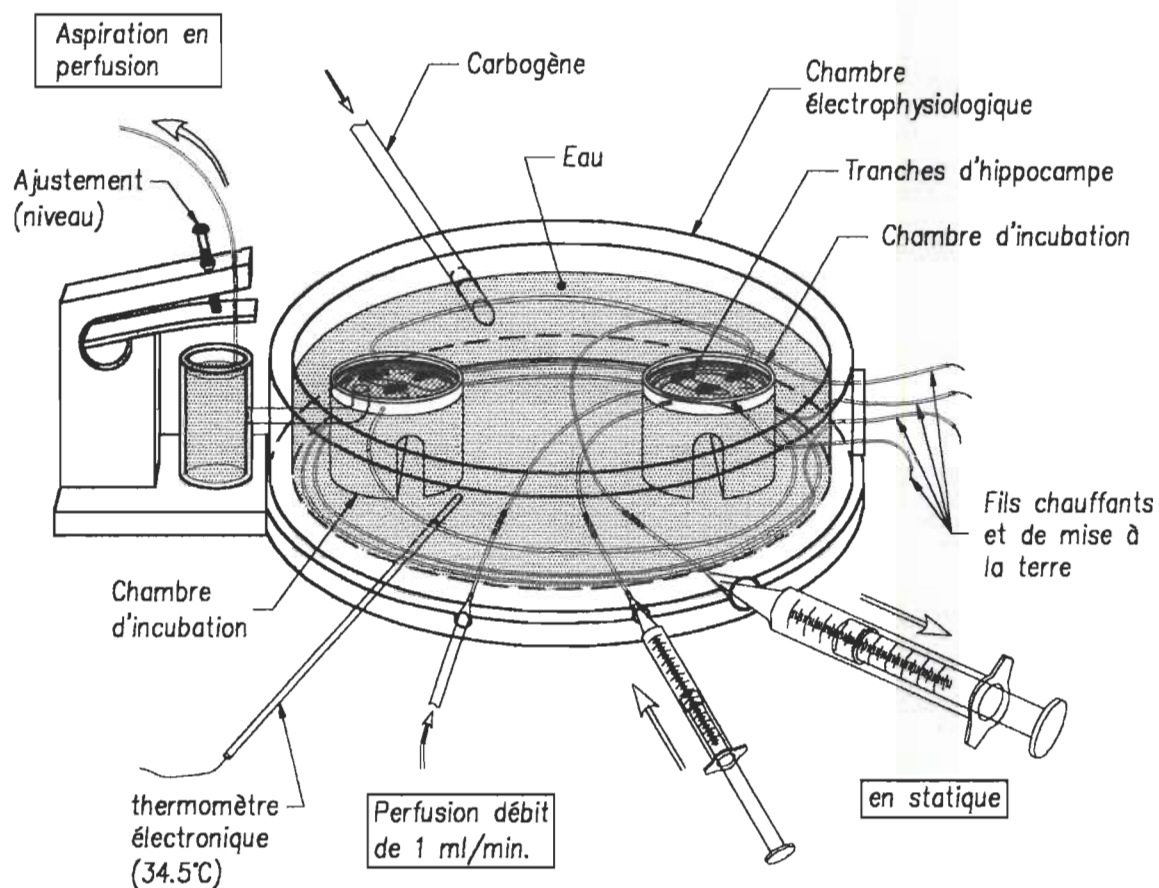


Figure 5. Représentation schématique d'une chambre électrophysiologique (illustration Guy Therrien).

oxygénait les coupes par diffusion dans le liquide physiologique dans lequel se trouvaient les tranches d'hippocampe.

2.2 ÉTUDE ÉLECTROPHYSIOLOGIQUE DES COUPES

D'HIPPOCAMPE DE SOURIS.

Une période de repos de 60 minutes était observée avant l'enregistrement électrophysiologique afin de permettre aux cellules des tranches d'hippocampe de se stabiliser suite au stress subit lors de la dissection. Après cette période d'incubation, une électrode de stimulation et une autre d'enregistrement étaient positionnées sur une tranche d'hippocampe au niveau du circuit synaptique à étudier (Fig.3). Des potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSE) étaient évoqués, dans la région CA₁, suite à l'excitation des fibres commissurales de Schaffer par une électrode de stimulation bipolaire. Ces PPSE évoqués étaient détectés et transformés en signaux électriques à l'aide d'une électrode d'enregistrement (micropipette de verre contenant une solution de NaCl 2M), positionnée dans le champ postsynaptique de la région CA₁ de l'hippocampe. Les signaux électriques engendrés étaient d'abord amplifiés puis enregistrés à l'aide du logiciel Scope sur support informatique IBM en vue de leur analyse ultérieure. Pour chacune des expériences, la fonctionnalité du circuit synaptique ciblé était

évaluée par le succès d'évocation de PPSE d'amplitudes similaires suivant une stimulation continue toutes les 30 secondes à une fréquence de 0,033 Hz. L'enregistrement de ces PPSE durant la période suivant un traitement expérimental (paramètres de stimulation du circuit ou conditions d'incubation des tranches) constituait une ligne de réponse synaptique pouvant être comparée à la ligne de base contrôle, formée par l'enregistrement des PPSE évoqués avant tout traitement expérimental. De plus, pour chaque expérience, l'ensemble des données les plus élevées et les plus faibles étaient supprimées et une moyenne des expérimentations des différentes souris était effectuée.

2.2.1 Études des récepteurs AMPA et NMDA avec une intensité électrique croissante.

Suite au sectionnement transversal en tranche de l'hippocampe, la partie CA₃ a été supprimée avant que les coupes ne soient déposées délicatement dans la chambre d'incubation d'une chambre électrophysiologique. Lors de cette première expérience, les conditions expérimentales ont été ajustées afin d'observer séparément les réponses des récepteurs NMDA et AMPA. Ces mesures étaient effectuées sur des souris contrôles et diabétiques, en fonction d'une intensité électrique croissante, variant entre 100 μ A et 600 μ A (par

intervalle de 100 μ A) et ce, après l'obtention d'une ligne de base s'étendant sur environ 20 minutes.

Tel que mentionné précédemment, lors d'une stimulation électrique simple (0,033 Hz), c'est principalement la stimulation des récepteurs AMPA qui est responsable de produire la réponse synaptique de base dans l'hippocampe. Ainsi, l'étude des propriétés électrophysiologiques des récepteurs AMPA dans cette expérience ne nécessite pas de modification de la composition du liquide physiologique. Toutefois, les récepteurs NMDA ne sont pas sollicités lors d'une transmission neuronale simple. Par conséquent, pour favoriser les réponses de ces récepteurs, la concentration en magnésium, l'élément qui bloque l'entrée du canal de ce récepteur, était réduite à 50 μ M dans le liquide physiologique. De plus, 30 μ M de 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX ; un antagoniste des récepteurs AMPA) était ajouté au liquide physiologique, défavorisant les réponses des récepteurs AMPA. Lors de cette expérience, les tranches d'hippocampes étaient incubées en statique dans la solution de Krebs.

2.2.2 Impact du diabète sur la LTP hippocampale induite par stimulation tétanique.

Lors de la deuxième expérience, la potentialisation neuronale chez les souris contrôles, les souris diabétiques et les souris diabétiques traitées à l'insuline était étudiée pour déterminer les différences susceptibles d'être obtenues. Pour ce faire, une stimulation de haute fréquence (SHF), composée de dix trains formés de quatre stimulations à 100 Hz, lesquels trains étaient espacés d'un intervalle de 200 msec, fut appliquée afin de générer la potentialisation neuronale dans la région CA₁ de l'hippocampe, au niveau de la voie commissurale de Schaffer. Durant cette expérience, les tranches d'hippocampes étaient incubées dans du Krebs perfusé à un débit d'environ 1 ml/min.

2.2.3 Impact du diabète sur la LTP hippocampale induite par dépolarisation chimique.

Dans le cas de la troisième expérience, un autre type de potentialisation était réalisé. Cependant, cette potentialisation n'était pas induite par stimulation électrique, mais par une augmentation de la concentration de KCl dans le liquide physiologique. Tel que dans la précédente expérience, le liquide physiologique était en perfusion (1 ml/min.). Suite au sectionnement en tranches de l'hippocampe, la partie CA₃ et le gyrus dentelé furent supprimés avant que les coupes ne soient déposées délicatement dans la chambre d'incubation. Puis, après

l'enregistrement de la ligne de base, le liquide physiologique était remplacé pendant 3 minutes par du liquide physiologique contenant 50 mM de KCl et une réduction équimolaire de la concentration de NaCl tel que décrit par Chabot et ses collaborateurs en 1996. L'enregistrement des réponses synaptiques a été effectué au cours des 20 minutes suivant le traitement au KCl.

2.2.4 Procédure d'hypoxie sur tranches d'hippocampe.

Au cours de cette dernière expérience, une période d'hypoxie fut imposée aux tranches d'hippocampes afin de vérifier la qualité de récupération de la réponse synaptique post-hypoxique entre les souris diabétiques et les souris contrôles. La période transitoire d'hypoxie a été provoquée par le remplacement du mélange carbogène dans le milieu physiologique par un mélange d'azote de haute pureté (N_2). Dans cette condition expérimentale, la réponse synaptique se trouve réduite, et lorsque la perte des PPSE était complète, une période hypoxique de 40 secondes était imposée aux tranches d'hippocampe. À la fin de cette période, la réoxygénation du tissu était rétablie et le degré de récupération de la transmission synaptique était quantifié par rapport à la ligne de base préalablement établie dans les 20 minutes précédant l'imposition de l'hypoxie.

RÉSULTATS

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

Afin de mettre en lumière les effets précoces du diabète mellitus sur la fonction des neurones glutamatergiques du cerveau, des études ont été réalisées sur des tranches d'hippocampes de souris NOD, un modèle animal génétiquement prédisposé au DID. Dans ce modèle, plus de 80% des souris développe un diabète sévère entre l'âge de 8 à 12 semaines et, comme chez l'humain, l'affection s'avère habituellement fatale en l'absence d'un traitement à l'insuline. Lors de nos expérimentations 80% des souris NOD ont développé le diabète.

3.1.1 Impact du diabète sur la fonction excitatrice de l'hippocampe.

Le premier objectif de cette étude avait essentiellement pour but d'évaluer les conséquences précoces du diabète sur la fonction excitatrice de l'hippocampe, notamment celle assurée par les récepteurs glutamatergiques de type NMDA et AMPA. L'apparition du diabète chez la souris fut établie à l'aide d'un test de détection urinaire (Chemstrip) et l'ensemble des expériences électrophysiologiques fut effectué chez des animaux ayant été soumis à une

glycosurie d'une durée n'excédant pas une semaine. À la fin de cette période, la concentration plasmatique de glucose moyenne était de $22,20 \pm 4,29$ mM (n=6) chez les souris NOD, pour une augmentation de 2,5 fois de la concentration plasmatique de glucose par rapport aux animaux contrôles ($8,94 \pm 0,88$ mM; n=6).

La figure 6 présente l'analyse des potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSE) évoqués par des stimulations électriques croissantes (100 à 600 μ A) des afférences commissurales de Schaffer dans la région CA₁ de l'hippocampe. Les données obtenues représentent la pente des PPSE exprimée en valeur absolue (mV/msec) qui furent recueillies sur des tranches d'hippocampes, préalablement incubées dans un milieu physiologique contenant, notamment, une concentration normale de magnésium (2,5 mM). Dans cette condition, les réponses excitatrices de l'hippocampe sont essentiellement révélatrices de l'activation des récepteurs AMPA par le glutamate. En effet, la contribution des récepteurs NMDA dans la transmission synaptique est habituellement marginale puisque ces récepteurs se voient bloqués par les ions magnésium contenus dans la solution saline. Or, chez les souris NOD, nous constatons que les réponses excitatrices assurées par les récepteurs AMPA sont grandement altérées dans la région CA₁ de l'hippocampe et ce, pour l'ensemble des stimulations électriques utilisées. Par exemple,

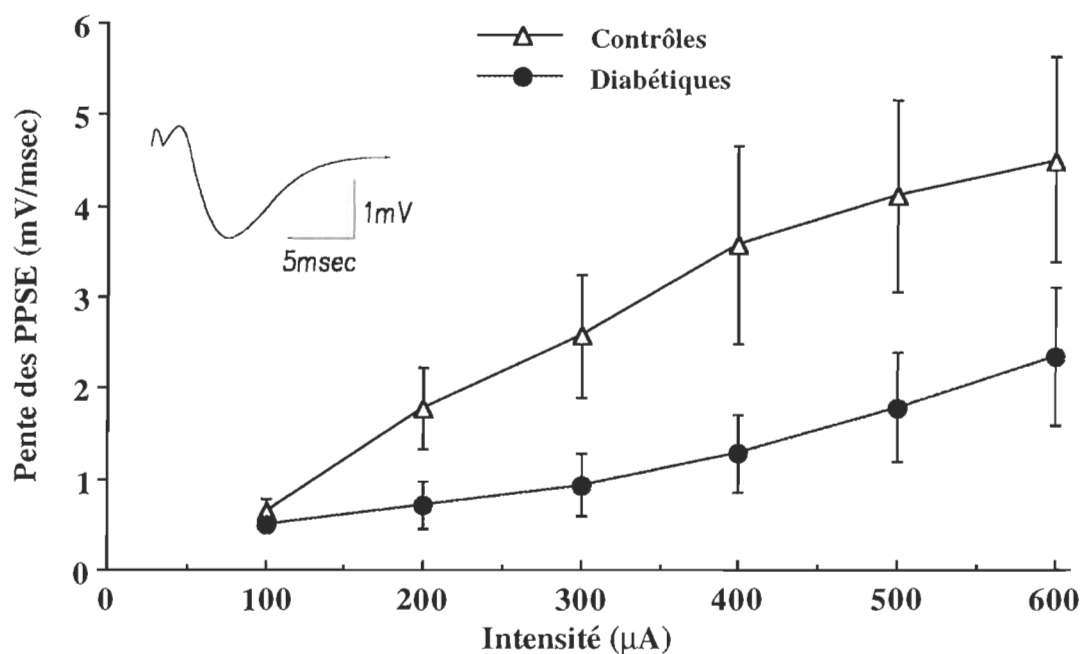


Figure 6. Impact du diabète sur la réponse glutamatergique assurée par les récepteurs de type AMPA. Les PPSE furent évoqués au niveau de la voie commissurale de Schaffer dans la région CA₁ de l'hippocampe. Un exemple de PPSE est présenté dans la partie gauche du graphique. Les données représentent la réponse des récepteurs AMPA à différentes intensités (moyenne \pm erreur-type de 6 expériences).

pour une intensité de stimulation de 400 μ A, la réponse excitatrice évoquée lors de l'activation des récepteurs AMPA se voit réduite par un facteur de 2,8 chez l'animal diabétique ($1,27 \pm 0,42$ mV/ms; n=6) par rapport aux animaux contrôles ($3,57 \pm 1,08$ mV/ms; n=6, $P < 0.05$).

En ce qui concerne les réponses excitatrices de type NMDA, elles furent révélées après que les tranches d'hippocampes aient été maintenues dans un salin physiologique carencé en ions magnésium (50 μ M). Évidemment, l'ajout à ce salin physiologique d'un antagoniste préférentiel des récepteurs AMPA, le 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (à une concentration de 30 μ M), a permis d'isoler pharmacologiquement les réponses synaptiques assurées par les récepteurs NMDA. La figure 7 présente l'analyse des potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSE) évoqués par des stimulations électriques croissantes (100 à 600 μ A) des afférences commissurales de Schaffer dans la région CA₁ de l'hippocampe dans ce milieu physiologique modifié. Les données obtenues représentent, ici encore, la pente des PPSE exprimée en valeur absolue (mV/msec). Or, en ce qui concerne les réponses excitatrices de type NMDA, nous constatons que l'activation de ces récepteurs n'est pas modifiée par l'état diabétique dans la région CA₁ de l'hippocampe par rapport aux animaux contrôles (Fig. 7). Pour une stimulation électrique d'intensité de 400 μ A, les réponses NMDA générées dans le salin

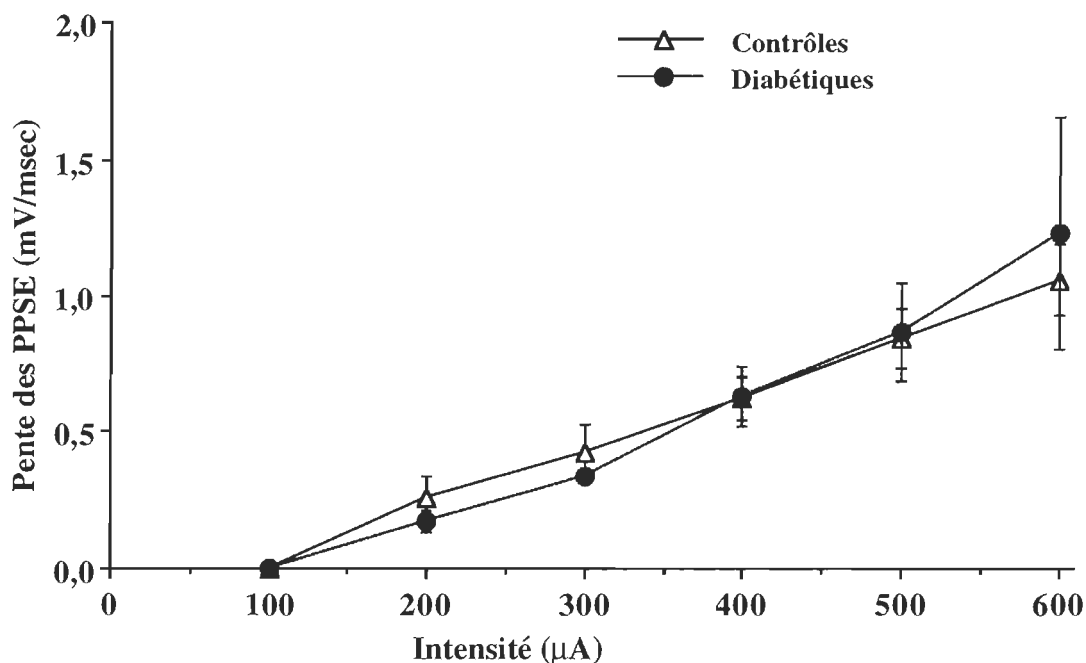


Figure 7. Impact du diabète sur la réponse glutamatergique assurée par les récepteurs de type NMDA. Les PPSE furent évoqués au niveau de la voie commissurale de Schaffer dans la région CA₁ de l'hippocampe. Les récepteurs NMDA sont pharmacologiquement isolés par l'ajout de DNQX et une réduction de magnésium du salin physiologique (50 μM). Les données représentent la réponse des récepteurs NMDA à différentes intensités (moyenne \pm erreur-type de 6 expériences).

modifié ont été respectivement établies à $0,62 \pm 0,08$ mV/ms et $0,63 \pm 0,11$ mV/ms chez les animaux contrôles et diabétiques.

3.1.2 Impact du diabète sur la plasticité électrophysiologique de l'hippocampe.

3.1.2.1 Analyse de la LTP induite par des stimulations électriques de hautes fréquences.

Une deuxième série d'expériences a été effectuée afin de mettre en lumière les effets précoces du diabète sur la plasticité neuronale de l'hippocampe notamment, de la LTP, un modèle électrophysiologique de la mémoire. Pour ce faire, une période d'enregistrement d'une durée de 20 minutes fut initialement consacrée afin d'établir la stabilité fonctionnelle de la préparation, en réponse à l'application de stimulations électriques constantes de la voie commissurale de Schaffer.

À la fin de cette période d'enregistrement, définie comme ligne de base, une courte période de stimulations téaniques à hautes fréquences fut appliquée de manière à favoriser l'induction de la LTP. Ainsi, dans le cadre de la présente

étude, dix trains de stimulations téaniques (espacés par un intervalle de 200 msec) ont été appliqués dans la région CA₁ de l'hippocampe de manière à favoriser l'induction de la LTP; un train de stimulations étant composé de 4 pulsations électriques appliquées à une fréquence de 100 Hz. Dans cette série d'expérience, la concentration plasmatique de glucose moyenne était de $9,08 \pm 0,89$ mM pour les souris contrôles, $19,71 \pm 2,45$ mM pour les souris diabétiques et de $12,71 \pm 0,95$ mM pour les souris diabétiques traitées à l'insuline. La figure 8 montre les effets de la stimulation téanique sur la transmission neuronale glutamatergique de l'hippocampe. Nous constatons, dans un premier temps, une augmentation importante de la transmission neuronale dans les premières minutes qui suivent l'application de cette stimulation téanique dans le secteur CA₁ de l'hippocampe. Durant les 5 premières minutes de cette potentialisation neuronale (dite à court terme), les réponses excitatrices de l'hippocampe se voient accrues d'environ 115% par rapport aux réponses excitatrices produites lors de l'établissement de la ligne de base. Par ailleurs, nous notons que cette forme de potentialisation diminue graduellement au cours de l'expérience pour atteindre une valeur moyenne de 85% et ce, pendant les 10 à 15 minutes suivant l'application de la stimulation téanique. À partir de ce moment, l'augmentation de la transmission synaptique se maintiendra habituellement à cette valeur et sera définie à la fin des enregistrements électrophysiologiques

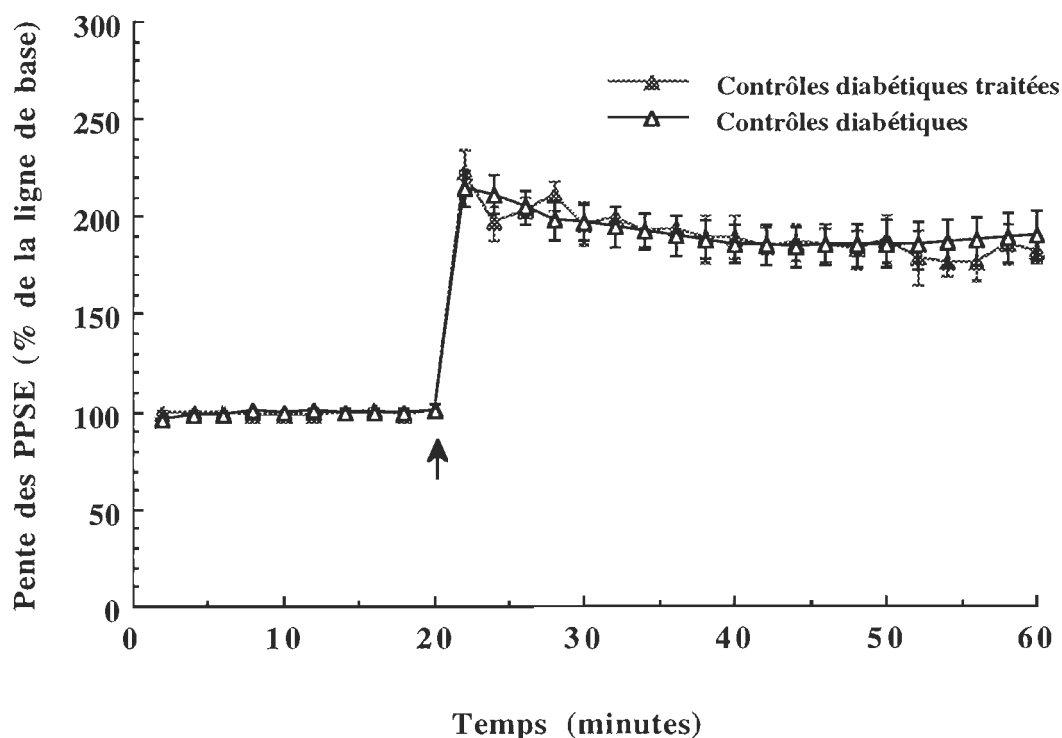


Figure 8. Degré de potentialisation neuronale dans des tranches d'hippocampes de souris NON/LtJ (contrôles et contrôles ayant subi le même traitement que les souris NOD/LtJ traitées à l'insuline mais sans l'insuline). Les PPSE furent évoqués au niveau de la voie commissurale de Schaffer dans la région CA₁ de l'hippocampe. Après une période de 20 minutes d'enregistrement de ligne de base, une stimulation de haute fréquence (SHF) fut administrée (voir section méthodes). La flèche indique la période à laquelle la SHF fut imposée. Les données représentent la pente des PPSE et sont exprimées en pourcentages de la moyenne des PPSE obtenus au cours de l'établissement de la ligne de base (moyenne \pm erreur-type de 11 expériences).

comme processus de potentialisation à long terme (ou LTP).

Chez les souris NOD, nous constatons que la présence du diabète n'affecte en rien la stabilité des réponses excitatrices de l'hippocampe au cours de l'enregistrement de la ligne de base (Fig. 9). Toutefois, il apparaît que la présence du diabète modifie grandement la capacité des neurones de l'hippocampe à produire le phénomène de potentialisation neuronale suite à l'application de stimulations téaniques dans la région CA₁. L'analyse des données expérimentales révèle que les pourcentages de potentialisation dans cette région de l'hippocampe sont grandement réduits chez les souris NOD. Nous constatons, en effet, que les niveaux de potentialisation à court et à long terme s'établissent respectivement à des valeurs de 50% et 30% chez les sujets diabétiques, une baisse d'environ 2,8 fois par rapport aux animaux contrôles (Fig. 9). Par ailleurs, chez les souris NOD traitées à l'insuline nous observons une récupération substantielle des niveaux de potentialisation neuronale dans l'hippocampe (Fig. 10). L'histogramme présenté à la figure 11 permet d'illustrer les changements de la plasticité neuronale lors du diabète. En particulier, cette figure nous permet d'apprécier la perte de STP (short term potentiation) et de LTP dans l'hippocampe des souris NOD et le renversement quasi-complet de ces déficits électrophysiologiques par un traitement à l'insuline.

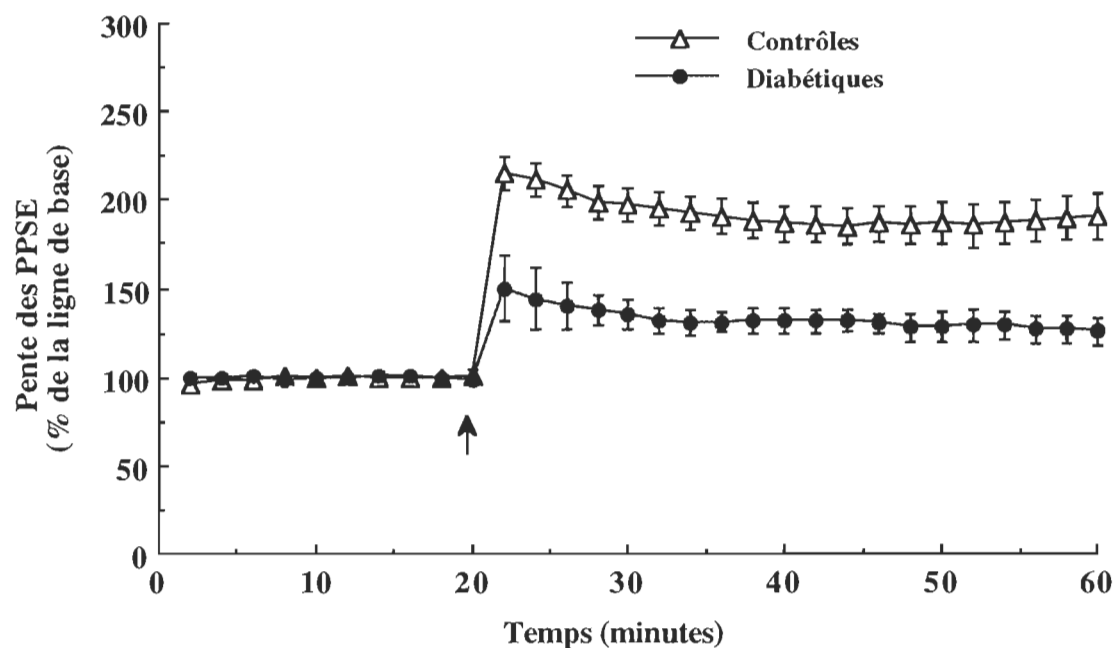


Figure 9. Degré de potentialisation neuronale dans des tranches d'hippocampes de souris NON/LtJ (contrôles) et NOD/LtJ diabétiques. Les PPSE furent évoqués au niveau de la voie commissurale de Schaffer dans la région CA₁ de l'hippocampe. Après une période de 20 minutes d'enregistrement de ligne de base, une stimulation de haute fréquence (SHF) fut administrée (voir section méthodes). La flèche indique la période à laquelle la SHF fut imposée. Les données représentent la pente des PPSE et sont exprimées en pourcentages de la moyenne des PPSE obtenus au cours de l'établissement de la ligne de base (moyenne \pm erreur-type de 11 expériences).

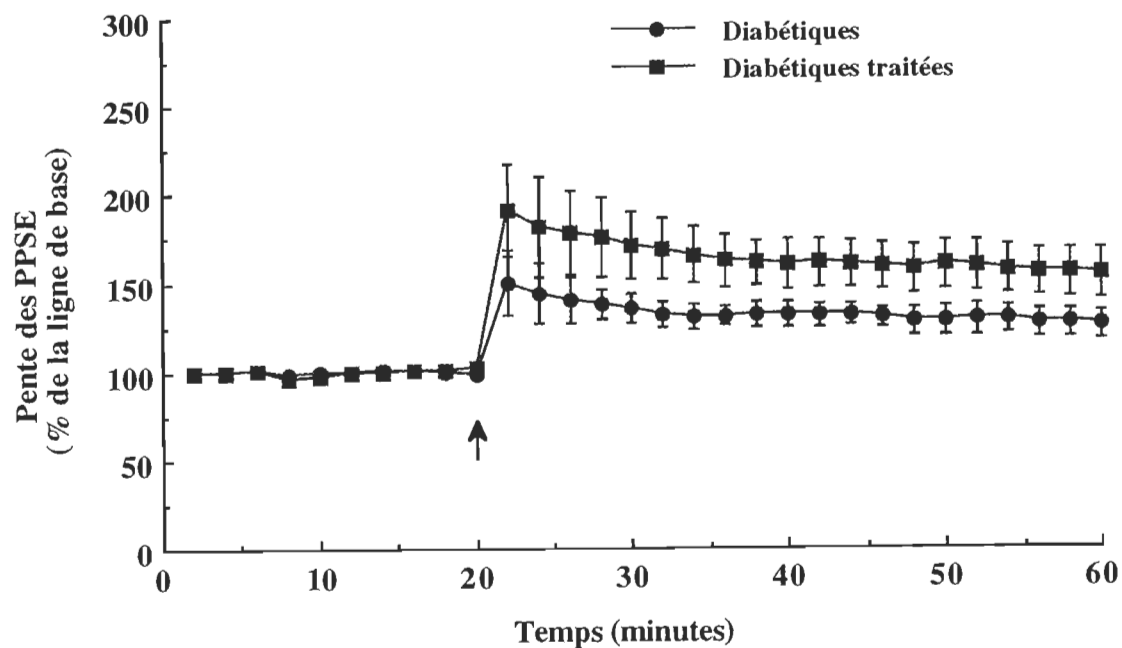


Figure 10. Degré de potentialisation neuronale dans des tranches d'hippocampes de souris NOD/LtJ diabétiques et NOD/LtJ diabétiques traitées à l'insuline. Les PPSE furent évoqués au niveau de la voie commissurale de Schaffer dans la région CA₁ de l'hippocampe. Après une période de 20 minutes d'enregistrement de ligne de base, une stimulation de haute fréquence (SHF) fut administrée (voir section méthodes). La flèche indique la période à laquelle la SHF fut imposée. Les données représentent la pente des PPSE et sont exprimées en pourcentages de la moyenne des PPSE obtenus au cours de l'établissement de la ligne de base (moyenne \pm erreur-type de 11 expériences).

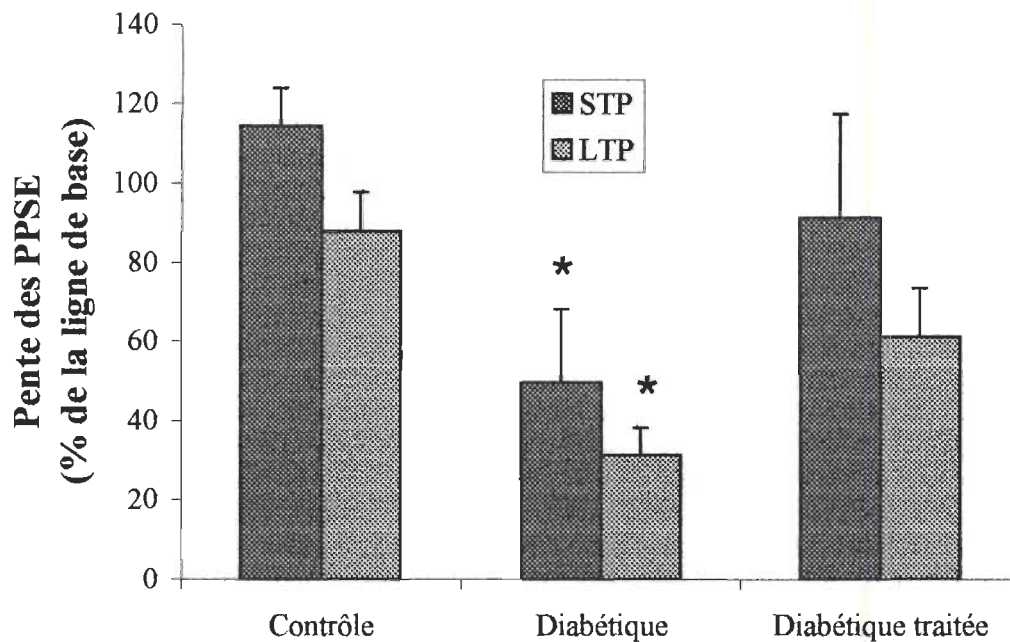


Figure 11. Degré de potentialisation neuronale dans des tranches d'hippocampes de souris contrôles (NON/LtJ), diabétiques (NOD/LtJ) et diabétiques traitées à l'insuline (NOD/LtJ). Les PPSE furent évoqués au niveau de la voie commissurale de Schaffer dans la région CA₁ de l'hippocampe. Après une période de 20 minutes d'enregistrement de ligne de base, une stimulation de haute fréquence fut administrée (voir section méthodes). Les données représentent le pourcentage d'augmentation de la LTP (STP et LTP stable) et sont exprimées en pourcentages de la moyenne des PPSE obtenus au cours de l'établissement de la ligne de base (moyenne \pm erreur-type de 11 expériences).

3.1.2.2 Analyse de la LTP induite par dépolarisation chimique.

L'activation des récepteurs NMDA, nécessaire à l'induction de la LTP hippocampale, résulte essentiellement de la présence d'une dépolarisation membranaire, produite lors d'une activité intense des neurones postsynaptiques. Par conséquent, un déficit de dépolarisation membranaire pourrait être mis en cause afin d'expliquer la réduction de la potentialisation neuronale lors du diabète.

Dans ce contexte, des expériences ont été menées de manière à évaluer l'impact d'une dépolarisation chimique sur la capacité des neurones glutamatergiques à produire la LTP. La figure 12 montre le profil de variation temporel des réponses glutamatergiques, obtenu dans la région CA₁ de l'hippocampe et résultant d'une période transitoire de dépolarisation membranaire induite par le KCl. Les enregistrements électrophysiologiques débutaient par l'établissement d'une ligne de base. À la fin de cette période d'enregistrement, les tranches d'hippocampe étaient alors perfusées par un salin physiologique contenant un excès de KCl (50 mM), pour une durée de 3 minutes. Or, nous constatons que les réponses excitatrices de l'hippocampe disparaissent rapidement suite à la présence de KCl dans le salin physiologique, phénomène qui résulte de la dépolarisation membranaire.

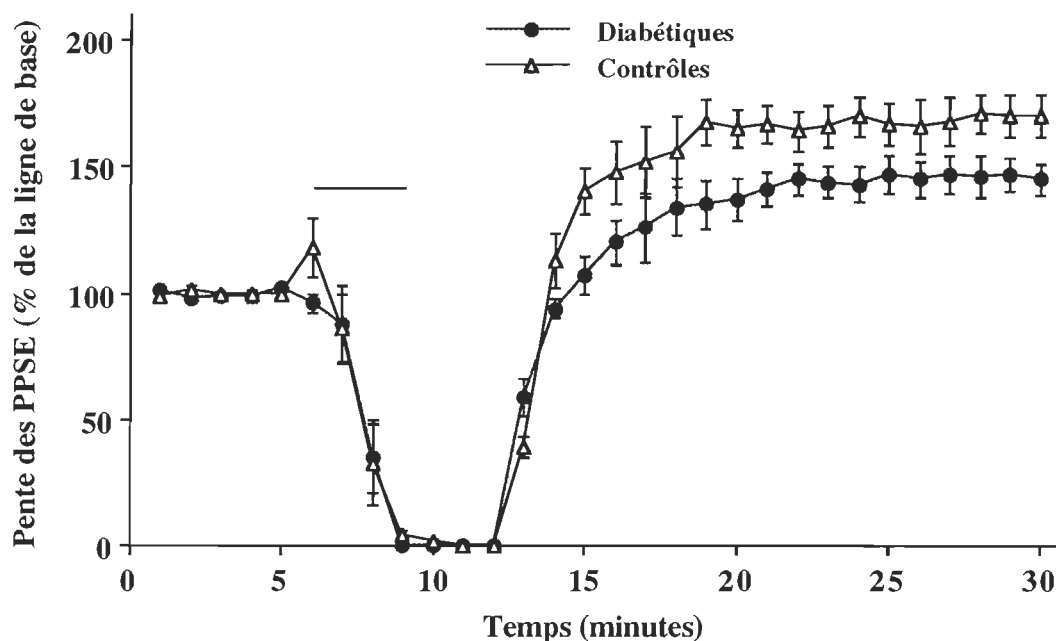


Figure 12. Récupération de la réponse synaptique après une période transitoire d'augmentation de la concentration de KCl dans des tranches d'hippocampes chez des souris NON/LtJ (contrôles) et NOD/LtJ diabétiques. Les PPSE furent évoqués au niveau de la voie commissurale de Schaffer dans la région CA₁ de l'hippocampe. Après une période de 5 minutes d'enregistrement de ligne de base, une période transitoire d'augmentation à 50 mM de KCl est soumise pour une durée de 3 minutes (voir section méthodes). La barre horizontale indique la période à laquelle l'augmentation de KCl fut imposée. Les données représentent la pente des PPSE et sont exprimées en pourcentages de la moyenne des PPSE obtenus au cours de l'établissement de la ligne de base (moyenne \pm erreur-type de 6 expériences).

Toutefois, une récupération complète de la transmission neuronale s'effectue dans les 10 minutes suivant l'application de KCl et nous notons, avec le temps, une potentialisation importante des circuits hippocampiques préalablement dépolarisés (Fig. 12). Plus précisément, le pourcentage de potentialisation neuronale s'établit chez les animaux contrôles à une valeur d'environ 70% par rapport à celle établie lors de la ligne de base et ce, 40 minutes après l'application de KCl. Dans le cadre du présent travail, nous constatons que cette forme de potentialisation neuronale est aussi altérée dans le secteur CA₁ des souris diabétiques. Par ailleurs, de 70% qu'était le niveau de LTP chez les souris contrôles, il est passé à une valeur de seulement 45% chez les souris NOD (Fig. 12) (concentration plasmatique de glucose moyenne : contrôles ; $7,52 \pm 1,47$ mM, diabétiques ; $17,11 \pm 3,92$ mM).

3.1.3 Impact du diabète sur la récupération de la transmission neuronale suite à un épisode transitoire d'hypoxie.

Le dernier objectif de ce travail visait à déterminer les effets du diabète sur la vulnérabilité des neurones de l'hippocampe et ce, au cours d'un traumatisme hypoxique. Dans cette série d'expériences, la concentration plasmatique de glucose moyenne était de $18,62 \pm 3,05$ mM (n=6) chez les souris NOD, pour une

concentration plasmatique de glucose d'environ 2 fois celle des animaux contrôles ($9,29 \pm 0,84$ mM; $n=6$).

La région CA₁ de l'hippocampe étant particulièrement vulnérable, nous avons utilisé les techniques d'électrophysiologie pour déterminer comment une période d'hypoxie peut influencer la récupération de la réponse synaptique des souris diabétiques. Les enregistrements électrophysiologiques ont débuté par l'établissement d'une ligne de base d'environ 20 minutes qui permettait d'apprécier le degré de stabilité fonctionnelle de la préparation. La diffusion d'oxygène était ensuite interrompue et de l'azote de haute pureté était administré afin de favoriser l'élimination complète de l'oxygène résiduel, présent dans la préparation tissulaire. Suite à l'interruption complète de la transmission synaptique, induite par l'absence d'oxygène, une période de 40 secondes d'hypoxie était imposée aux tranches d'hippocampe, avant le rétablissement de la réoxygénation tissulaire. Elle était suivie d'une récupération partielle de la réponse synaptique, débutant après environ 8 minutes pour finalement se stabiliser autour de 70% (Fig.13 et 14). La superposition du graphique des souris diabétiques et des souris contrôles, ayant subies une hypoxie, ne démontre aucune différence quant à la récupération de la réponse synaptique. Les données représentant la pente des PPSE sont exprimées en pourcentages de la moyenne

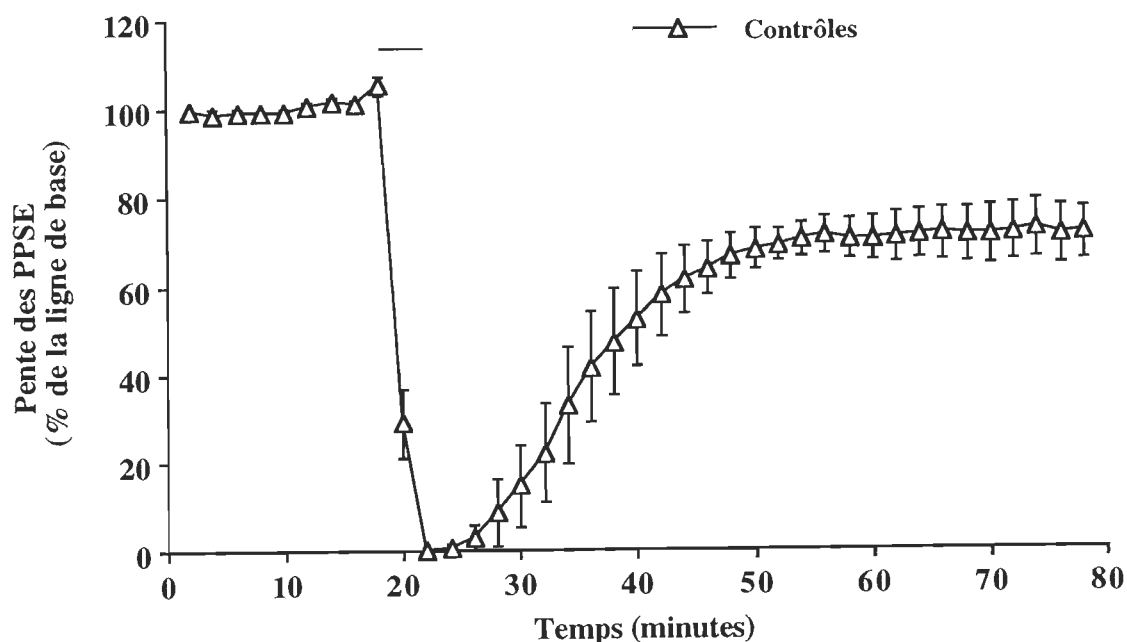


Figure 13. Récupération de la réponse synaptique après une période transitoire d'hypoxie dans des tranches d'hippocampes chez des souris NON/LtJ (contrôles). Les PPSE furent évoqués au niveau de la voie commissurale de Schaffer dans la région CA₁ de l'hippocampe. Après une période de 20 minutes d'enregistrement de ligne de base, une période transitoire d'hypoxie est soumise pour une durée de 40 secondes excédant la perte totale de l'enregistrement électrique des PPSE. La réoxygénation des tranches d'hippocampe est alors reprise. La barre horizontale indique la période à laquelle l'hypoxie fut imposée. Les données représentent la pente des PPSE et sont exprimées en pourcentages de la moyenne des PPSE obtenus au cours de l'établissement de la ligne de base (moyenne \pm erreur-type de 6 expériences).

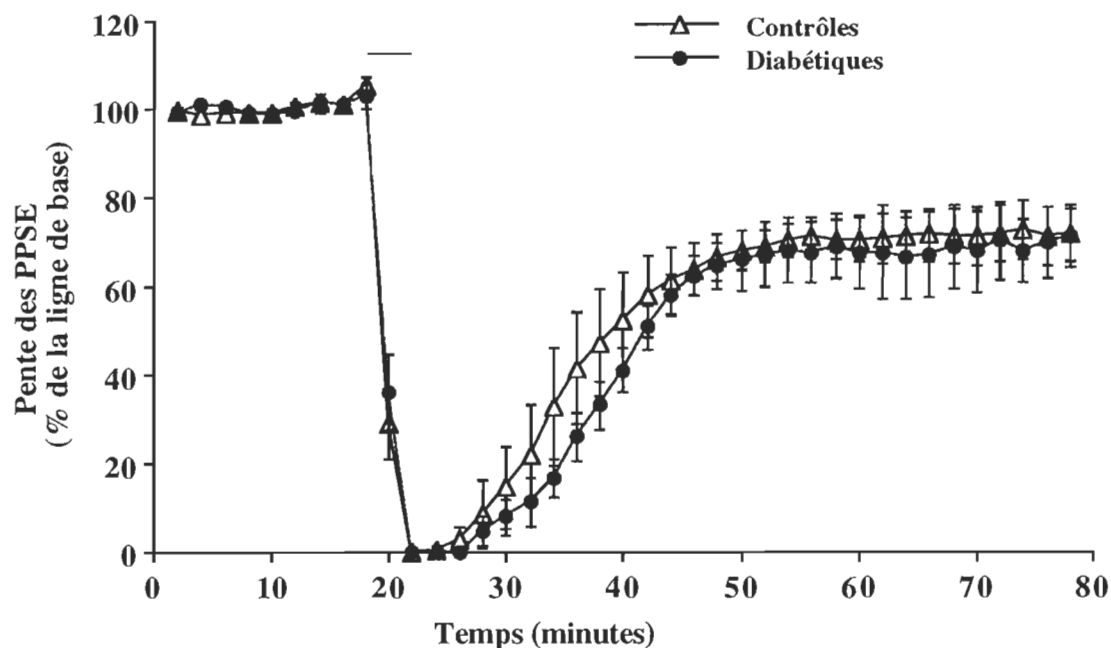


Figure 14. Récupération de la réponse synaptique après une période transitoire d'hypoxie sur des tranches d'hippocampes chez des souris NON/LtJ (contrôles) et NOD/LtJ diabétiques. Les PPSE furent évoqués au niveau de la voie commissurale de Schaffer dans la région CA₁ de l'hippocampe. Après une période de 20 minutes d'enregistrement de ligne de base, une période transitoire d'hypoxie est soumise pour une durée de 40 secondes excédant la perte totale de l'enregistrement électrique des PPSE. La réoxygénation des tranches d'hippocampe est alors reprise. La barre horizontale indique la période à laquelle l'hypoxie fut imposée. Les données représentent la pente des PPSE et sont exprimées en pourcentages de la moyenne des PPSE obtenus au cours de l'établissement de la ligne de base (moyenne \pm erreur-type de 6 expériences).

des PPSE obtenus au cours de l'établissement de la ligne de base (moyenne \pm erreur-type de 6 expériences).

DISCUSSION ET CONCLUSION

CHAPITRE 4

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'objectif principal de ce travail de maîtrise consistait à étudier l'impact du diabète sur la fonction glutamatergique des neurones du système nerveux central, notamment de ceux situés dans la région hippocampale. L'hippocampe est une structure importante du cerveau permettant le stockage des souvenirs, et dont la vulnérabilité lors de diverses conditions pathologiques est bien connue. En effet, des lésions de cette structure ont été rapportées chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer et chez les sujets ayant souffert d'un accident vasculaire cérébral, lésions qui sont accrues lors de l'état diabétique (Bell, 1994; Messier & Gagnon, 1996; Pulsinelli et al., 1983; Tuomilehto et al., 1996).

La destruction de l'hippocampe dans diverses conditions pathologiques est susceptible de survenir suite à l'activation excessive des récepteurs pour le neurotransmetteur glutamate. Or, dans une étude biochimique récente, il a été démontré que la liaison d'agonistes radioactifs aux récepteurs du glutamate était accrue dans les cerveaux de souris diabétiques (Valastro et al., 2000). En particulier, il apparaît que l'expression des récepteurs glutamatergiques est augmentée dans la région hippocampale et ce, dans les premiers jours qui suivent

le développement de l'hyperglycémie chez les souris prédisposées génétiquement au DID. Évidemment, et compte tenu de l'importance de ces récepteurs dans le développement de processus neurodégénératifs, il est probable que le niveau d'expression des récepteurs au glutamate puisse être un facteur important dans la vulnérabilité de cette région du cerveau chez les patients diabétiques.

Dans le cadre de la présente étude, nous avons tenté d'analyser les conséquences fonctionnelles de ces changements biochimiques induits par le diabète aux récepteurs glutamatergiques. Afin d'examiner spécifiquement cette question, la technique d'enregistrement en potentiel de champs a été utilisée comme approche expérimentale pour l'étude des réponses glutamatergiques dans la région CA₁ de l'hippocampe. Nos résultats montrent que la réponse glutamatergique, assurée par les récepteurs glutamatergiques de type AMPA, est grandement diminuée par le développement de l'état diabétique. Or, cette diminution des réponses AMPA dans les neurones de la région CA₁ de l'hippocampe est associée à une perte quasi-totale de l'expression du phénomène de la LTP dans cette région du cerveau (Bernard, Lahsaini, & Massicotte, 1994; Foster, Gagné, & Massicotte, 1996; Massicotte, Vanderklish, Lynch, & Baudry, 1991). Comme nous l'avons mentionné dans la section introduction de ce document, la présence de la LTP dans la région hippocampale semble essentielle à la création d'un environnement fonctionnel des neurones favorables au stockage

des souvenirs, notamment pour ceux faisant appel à des processus de mémorisation de type visuo-spatial (Shors & Matzel, 1997).

Il a été mis en évidence que le diabète favorise les problèmes cognitifs (Franceschi et al., 1984 ; Holmes et al., 1983; Mooradian et al., 1988 ; Perlmutter, Tun, Sizer, McGlinchey, & Nathan, 1987), particulièrement chez les personnes âgées, suggérant que les perturbations des réponses glutamatergiques de type AMPA et de la LTP sont responsables de l'apparition des troubles de la mémoire lors du diabète melitus chez l'humain (Flood, Mooradian, & Morley, 1990 ; Mooradian et al., 1988 ; Ryan et al., 1985). Une hypothèse qui s'avère vraisemblable puisqu'il est bien connu que des dommages à la mémoire et à la LTP surviennent chez des modèles animaux de diabète chronique (Biessels et al., 1996 ; Biessels et al., 1998 ; Chabot et al., 1997), en particulier chez les rats traités à la streptozotocine ; une drogue reconnue pour détruire les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, sécréteurs de l'insuline. Il apparaît toutefois que la détérioration fonctionnelle du cerveau lors du diabète chronique résulte d'une atteinte de l'intégrité morphologique des neurones, compte tenu de la nature irréversible des altérations comportementales et électrophysiologiques. Or, dans le cadre de la présente investigation, nous avons observé que les neurones de la région CA₁ de l'hippocampe présentent des déficits en LTP et ce, dans la première semaine qui suit l'apparition de l'état diabétique chez la souris NOD,

lesquels déficits peuvent être renversés par un traitement d'insuline. Ces dommages précoces à la LTP induits par le diabète montrent bien l'importance de la stabilité endocrine du pancréas sur la fonction du cerveau.

4.1.1 Induction de la LTP chez les souris NOD/LtJ.

Les causes cellulaires responsables du déficit en LTP chez les souris NOD demeurent inconnues. Il faut savoir que l'apparition du phénomène de la LTP résulte, du moins dans la région CA₁ de l'hippocampe, de l'activation transitoire des récepteurs au glutamate. Notre analyse électrophysiologique des réponses excitatrices assurées par les récepteurs NMDA ne révèle toutefois aucun changement de l'activation de ces récepteurs dans des conditions de stimulation de basses fréquences. L'approche expérimentale retenue dans le cadre de la présente étude ne permet malheureusement pas de considérer la fonction calcique du système récepteur NMDA. Il est connu que l'influx de calcium postsynaptique, résultant de l'activation des récepteurs NMDA, contribue de manière quasi-exclusive à l'induction de la LTP (Di Luca et al., 1999).

Par ailleurs, la composition en sous-unités protéiniques est l'un des facteurs déterminants dans le contrôle de la perméabilité calcique des canaux associés aux récepteurs NMDA, et une expression excessive de la sous-unité NR₂A du

récepteur NMDA fut récemment retrouvée dans les membranes synaptiques des souris NOD (Valastro et al., 2000). Or, un influx calcique inapproprié lors de la stimulation tétanique pourrait donc expliquer la présence du déficit en LTP chez les souris NOD et des expériences électrophysiologiques en mode "patch-clamp" devront évidemment être effectuées afin de vérifier cette hypothèse.

4.1.2 Maintien de la LTP chez les souris NOD/LtJ.

Bien que les neurobiologistes acceptent l'idée que le calcium contribue à l'induction de la LTP, la question du rapport entre cet ion et le maintien à long terme de ce phénomène de plasticité neuronale demeure entière. Les informations recueillies à ce jour convergent pour supporter deux grandes hypothèses dans le contexte du maintien de la LTP. La première hypothèse, dite présynaptique, propose qu'une augmentation de la quantité de glutamate libérée par les terminaisons nerveuses assure le maintien de la LTP. La deuxième, dite postsynaptique, suggère que le maintien de la LTP résulte essentiellement de changements des propriétés fonctionnelles et biochimiques du récepteur AMPA, lequel assure la majorité des réponses glutamatergiques.

À ce jour, aucune de ces hypothèses n'a été retenue de façon exclusive afin d'expliquer le maintien de la LTP, du moins dans la région CA₁ de l'hippocampe.

Cependant, de récentes études électrophysiologiques ont démontré qu'une proportion importante des synapses glutamatergiques de l'hippocampe se trouve normalement dans un état silencieux, c.-à-d., insensibles à l'action du neurotransmetteur glutamate (Isaac, Nicoll, & Malenka, 1995; Liao, Hessler, & Malinow, 1995). Or, il a été proposé que la stimulation intense des afférences à glutamate, nécessaire pour l'induction de la LTP hippocampique, favorise la transformation de ces synapses dites silencieuses en synapses actives et ce, via l'ajout de récepteurs fonctionnels de type AMPA. Cette hypothèse est évidemment conforme aux études montrant que l'apparition de la potentialisation neuronale dans la région hippocampale est liée à une hausse sélective de la liaison du ^3H -AMPA à son récepteur (Bernard et al., 1994; Foster et al., 1996; Massicotte et al., 1991).

Nos résultats montrent que le diabète chez les souris NOD engendre une réduction importante et sélective des réponses glutamatergiques assurées par les récepteurs AMPA. Évidemment, l'apparente association entre la perte de LTP et une réduction des réponses AMPA vient supporter l'hypothèse d'une contribution postsynaptique dans la plasticité neuronale. Ainsi, les observations démontrant que les souris diabétiques conservent une capacité de générer des réponses NMDA comparables aux animaux contrôles semblent confirmer cette hypothèse. En effet, une perturbation de la fonction présynaptique chez l'animal diabétique

aurait dû se voir associée à des changements comparables des réponses glutamatergiques des deux types de récepteurs analysés dans le cadre de cette étude (i.e. récepteurs NMDA et AMPA). Sur le plan électrophysiologique, il sera bien sûr intéressant de vérifier si la présence des changements spécifiques apportés par le diabète aux réponses AMPA n'est pas liée à des perturbations de l'équilibre fonctionnel des synapses glutamatergiques, notamment en regard de la distribution des synapses silencieuses.

Selon plusieurs neurobiologistes, c'est l'influx de calcium produit au cours de la stimulation téтанique qui, par l'intermédiaire de processus enzymatiques situés dans les compartiments postsynaptiques des neurones, assurerait la modulation des récepteurs AMPA lors du maintien de la LTP (Ambros-Ingerson & Lynch, 1993 ; Baudry & Massicotte, 1991 ; Baudry & Massicotte, 1992 ; Kullmann, 1994 ; Manabe & Nicoll, 1994). En effet, plusieurs études ont démontré que les inhibiteurs de systèmes enzymatiques activés par le calcium, notamment ceux bloquant l'activation des protéines kinases, des phospholipases et des protéases neutres interfèrent avec le développement de la LTP dans la région CA₁ de l'hippocampe. L'activation de ces systèmes enzymatiques pourrait être un élément critique de la régulation des récepteurs AMPA à l'échelle de sa distribution subcellulaire. Parmi les différents mécanismes qui peuvent contribuer à la régulation des récepteurs AMPA dans la LTP, l'implication d'un changement

dans la distribution neuronale des récepteurs fut récemment proposée. Par exemple, l'ajout de récepteurs AMPA à la surface des membranes neuronales provenant des réserves intracellulaires a été récemment mis en évidence dans les neurones glutamatergiques soumis à la LTP. Cependant, une perturbation de ce mécanisme de régulation des récepteurs AMPA et de son implication dans les déficits de LTP lors du diabète est encore hypothétique. En effet, des changements dans la distribution des récepteurs AMPA lors de cette pathologie n'ont toujours pas été mis en évidence.

Pour Massicotte et ses collaborateurs (1991), l'activation d'enzymes susceptibles d'affecter l'environnement lipidique des membranes neuronales contribuerait à la modulation des récepteurs AMPA lors de la LTP (Bernard et al., 1994 ; Bernard et al., 1995 ; Chabot et al., 1998 ; Massicotte et al., 1991 ; Massicotte & Beaudry, 1991). Une activation inappropriée des récepteurs AMPA par l'environnement lipidique pourrait donc être présente dans le cerveau d'animaux diabétiques. Récemment, nous avons démontré que l'augmentation de l'affinité du récepteur AMPA, par un phospholipide de la membrane, est altérée dans la région hippocampale des souris NOD. Parmi les lipides qui peuvent moduler les récepteurs AMPA, la phosphatidylsérine (PS), comme lipide chargé négativement et localisé dans la portion interne de la membrane neuronale, semble incapable d'augmenter la liaison du ^3H -AMPA à son récepteur suite au

développement du diabète. Ainsi, la perte de modulation des récepteurs AMPA par la PS observée dans l'hippocampe de nos souris diabétiques pourrait contribuer à l'apparition des déficits en LTP dans cette condition. En fait, ces différents résultats suggèrent qu'une altération de la fonction glutamatergique est un des facteurs qui peut être impliqué dans la production des dommages cognitifs lors du diabète chez l'animal et l'humain.

4.1.3 Dommages à la communication neuronale dans l'hippocampe des souris NOD/LtJ.

La perte progressive des neurones dans les maladies neurodégénératives est accélérée chez les patients diabétiques. Parmi les différentes conditions pathologiques qui peuvent se voir accentuées par le diabète, l'accident vasculaire cérébral est une situation dont la vulnérabilité des neurones est accrue par un état d'hyperglycémie qu'il soit à caractère aigu ou chronique. Le niveau d'activité des récepteurs au glutamate est reconnu pour être un des éléments critiques de la détérioration des neurones lors d'un AVC, mais la ou les causes initiales qui conduisent à une mort neuronale exagérée lors du diabète sont encore énigmatiques.

Le diabète apparaît, d'autre part, comme un des facteurs de risques dans les maladies neurodégénératives liées au vieillissement, notamment au cours de la démence de type Alzheimer (Messier & Gagnon, 1996). Or, la démonstration que les niveaux d'expression des récepteurs NMDA sont accrus dans la région CA₁ de l'hippocampe lors du diabète (Li et al., 1999), suggère que les dommages induits à cette région du cerveau peuvent être accentués chez les souris NOD. Nos travaux sur la récupération des réponses glutamatergiques dans l'hippocampe des souris NOD semblent indiquer que l'hyperglycémie ou que l'hypoinsulinémie ne peuvent être mise en cause comme facteur essentiel de la détérioration neuronale suite à l'hypoxie, du moins en ce qui concerne les dommages à court terme, induits à la transmission neuronale dans la région CA₁ de l'hippocampe. Évidemment, des expériences supplémentaires seront requises pour élucider les effets du diabète sur les conséquences à long terme de l'hypoxie cérébrale.

D'autre part, il est connu que l'activation des récepteurs NMDA peut engendrer l'activation de systèmes enzymatiques capables de favoriser la production de radicaux libres comme l'oxyde nitrique et le superoxyde. En fait, notre laboratoire a récemment démontré que l'application *in vitro* de NMDA sur des tranches d'hippocampe génère une augmentation des dommages oxydatifs aux protéines et aux lipides. L'implication du stress oxydatif comme un des

mécanismes des processus de mort neuronale est bien connue, notamment dans les processus d'apoptose.

Une activation inappropriée de l'apoptose, programme cellulaire d'auto-destruction, est susceptible de contribuer à la perte accélérée des neurones dans les maladies neurodégénératives caractéristiques du vieillissement. Par exemple, ce mode de mort cellulaire a été mis en évidence dans les neurones de la substance noire des patients atteints de la maladie de Parkinson et dans les neurones des sujets Alzheimer (Bear et al., 1997). De plus, l'implication de l'apoptose comme un des mécanismes du processus de neurodégénérescence lors du diabète est suggérée par les observations d'un phénomène accéléré d'apoptose dans les neurones du système nerveux périphérique (Russell, Sullivan, Windebank, Herrmann, & Feldman, 1999).

Les résultats récents en faveur d'une régulation à la hausse du niveau d'expression des récepteurs NMDA chez la souris NOD sont bien sûr compatibles avec l'idée d'une altération potentielle des processus apoptotiques dans le système nerveux central. L'apoptose comme mécanisme de mort neuronale se voit directement induite par l'activation *in vivo* des récepteurs NMDA et il sera intéressant de mesurer la progression des phénomènes apoptotiques dans le cerveau des souris NOD. Par exemple, l'implication potentielle du changement

apoptotique et de l'état oxydatif au cours du diabète pourrait être déterminée dans des conditions de neurodégénérescences reconnues pour nécessiter une activation excessive des récepteurs NMDA, notamment lors de l'injection de kainate.

4.2 CONCLUSION.

Notre étude montre clairement qu'un état diabétique à caractère précoce engendre dans la région hippocampale une perturbation des mécanismes électrophysiologiques qui peut être à l'origine de déficits lors du stockage des informations dans le cerveau. Par ailleurs, ces résultats suggèrent que des altérations spécifiques des réponses glutamatergiques assurées par les récepteurs AMPA contribuent à l'apparition des dommages cognitifs lors de l'état diabétique. Cependant, le dommage induit à court terme au niveau de la transmission neuronale et, consécutif à une période d'hypoxie, ne semble pas modifié par l'état diabétique. Cette observation s'avère peu conforme aux évidences impliquant le diabète comme facteur de risque de la neurodégénérescence. Des expériences futures, portant sur la progression des mécanismes apoptotiques, devront être réalisées afin d'élargir nos connaissances en regard des effets du diabète sur les processus d'auto-destruction neuronale dans des conditions de neurodégénérescence chronique.

RÉFÉRENCES

RÉFÉRENCES

- Abbott, R. D., Donahue, R. P., MacMahon, S. W., Reed, D. M., & Yano, K. (1987). Diabetes and the risk of stroke. *J. Am. Med. Assoc.*, 257, 949-952.
- Aihara, T., Tsukada, M., Crair, M.A.C., & Shinomoto, S. (1997). Stimulus-dependent induction of long-term potentiation in CA1 area of the hippocampus - Experiment and model. *Hippocampus*, 7, 416-426.
- Altomare, D., Vendemiale, G., Chicco, D., Procacci, V., & Cirelli, F. (1992). Increased lipid peroxidation in type 2 poorly controlled diabetic patients. *Diabetes Metab.*, 18, 264-71.
- Altomare, D., Vendemiale, G., Grattagliano, Y., Angelini, P., Micelli-Ferrari, T., & Cardia, L. (1995). Human diabetic cataract : Role of lipid peroxidation. *Diabetes Metab.*, 21, 173-9.
- Ambros-Ingerson, J., & Lynch, G. (1993). Channel gating kinetics and synaptic efficacy : A hypothesis for expression of long term potentiation. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 90, 7903-7907.
- Artola, A., Broecher, S., & Singer, W. (1990). Different voltage-dependent thresholds for inducing long-term depression and long-term potentiation in slices of rat visual cortex. *Nature*, 347, 69-72.
- Artola, A., & Singer, W. (1993). Long-term depression of excitatory synaptic transmission and its relationship to long-term potentiation. *TINS*, 16, 480-487.
- Aust, S. D., Morehouse, L. A., & Thomas, C. E. (1985). Role of metals in oxygen radical reactions. *Free Radical. Biol. Med.*, 1, 3-7.

- Bale, R. N. (1973). Brain damage in diabetes mellitus. *Brit. J. Psychiat.*, 122, 337-41.
- Barrett-Connor, E., & Khaw, K. T. (1988). Diabetes mellitus : An independant risk factor for stroke ? *Am. J. Epidemiol.*, 128, 116-123.
- Bartus, R. T., Dean, R. L. III, Beer, B., & Lippa, A. S. (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*, 271, 408-417.
- Baudry, M., & Massicotte, G. (1992). Physiological and pharmacological relationships between long-term potentiation and mammalian memory. *Conc. Neurosci.*, 3, 79-98.
- Baudry, M., Massicotte, G., & Hauge, S. (1991). Phosphatidylserine increases the affinity of the AMPA/Quisqualate receptor in rat brain membranes. *Behav. Neural Biol.*, 55, 137-140.
- Bauduceau, B., Chatellier, G., Cordonnier, D., Marre, M., Mimran, A., Monnier, L., & Sauvanet, J. P. (1996). Hypertension artérielle et diabète. *Diabetes Metab.*, 22, 64-76.
- Baynes, J. W. (1991). Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, 40, 405-412.
- Bear, M. F., Connors, B.W., & Paradiso, M. A. (1997). Neurosciences : À la découverte du cerveau. Paris: Pradel.
- Bell, D. S. H. (1994). Stroke in the diabetic patient. *Diabetes Care*, 17, 213-219.

- Bernard, J., Chabot, C., Gagné, J., Baudry, M., & Massicotte, G. (1995). Melittin increases AMPA receptor affinity in rat brain synaptoneurosomes. *Brain Res.*, 671, 195-200.
- Bernard, J., Lahsaini, A., & Massicotte, G. (1994). Potassium-induced long term potentiation in area CA₁ of the hippocampus involves phospholipase activation. *Hippocampus*, 4, 447-453.
- Biessels, G. J., Kamal, A., Ramakers, G. M., Urban, I. J., Spruijt, B. M., Erkelens, D. W., & Gispen, W. H. (1996). Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, 45, 1259-1266.
- Biessels, G. J., Kamal, A., Urban, I. J., Spruijt, B. M., Erkelens, D. W., & Gispen, W. H. (1998). Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: Effects of insuline treatment. *Brain Research*, 800, 125-135.
- Biessels, G. J., & Van Dam, P. S. (1997). Diabetic neuropathy: Pathogenesis and current treatment perspectives. *Neurosci. Res. Commun.*, 10, 1-10.
- Bitar, M. S., & DeSouza, E. B. (1990). Diabetes-related changes in brain beta adrenoreceptors in rats as assessed by quantitative autoradiography : Relationship to hypothalamic norepinephrine metabolism and pituitary-gonadal hormone secretion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 254, 781-785.
- Bitar, M., koulu, M., Rapoport, S. I., & Linnoila, M. (1985). Diabetes-induced altération in brain monoamine metabolism in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 236, 432-437.
- Bland, B. H. (1986). The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms. *Prog. Neurobiol.*, 26, 1-54.

- Bliss, T. V. P., & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361, 31-9.
- Bliss, T. V. P., & Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate areas of the anesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.*, 232, 331-356.
- Burnashev, N., Zhou, Z., Neher, E., & Sakmann, B. (1995). Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *J. Physiol.*, 485, 403-418.
- Cattabeni, F., Gardoni, F., & Di Luca, M. (1999). Pathophysiological implications of the structural organization of the excitatory synapse. *European Journal of Pharmacology*, 375, 339-347.
- Ceriello, A., Quatraro, A., Caretta, F., Varano, R., & Giugliano, D. (1990). Evidence for a possible role of oxygen-free radicals in the abnormal functional arterial vasomotion in insulin-dependant diabetes. *Diabetes Metab.*, 16, 318-22.
- Chabot, C., Massicotte, G., Milot, M., Trudeau, F., & Gagné, J. (1997). Impaired modulation of AMPA receptors by calcium-dependent processes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Brain Res.*, 768, 249-56.
- Chan, P. H. (1996). Role of oxidants in ischemic brain-damage. *Stroke*, 6, 1124-1129.
- Chu, P. C., Lin, M. T., Shian, L. R., & Leu, S. Y. (1986). Alterations in physiologic functions and in brain monoamine content in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetes*, 35, 481-484.

- Congy, F., Bonnefont-Rousselot, D., Dever, S., Delattre, J., & Emerit, J. (1995). Étude du stress oxydant chez le sujet âgé. *Press Méd.*, 24, 1115-1119.
- Coomber, C. (1997). A model of associative long-term potentiation and long-term depression in a compartmental reconstruction of a neuron. *Neurocomputing*, 16, 189-205.
- Cox, D. J., & Gonder-Frederick, L. (1992). Major developments in behavioral diabetes research. *J. Consult. Clin. Psychol.*, 60, 628-38.
- Coyle, J. T., & Puttfarcken, P. (1993). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*, 262, 689-695.
- Crandall, E. A., Gillis, M. A., & Fernstrom, J. D. (1981). Reduction in brain serotonin synthesis rate in streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology*, 109, 310-312.
- Crastes de Paulet, A. (1990). Radicaux libres et vieillissement. *Biol. Clin.*, 48, 323-330.
- Crouch, R., Kimsey, G., Priest, D. G., Sarda, A., & Buse, M. G. (1978). Effect of streptozotocin on erythrocyte and retinal superoxide dismutase. *Diabetologia*, 15, 53-57.
- Curtis, D. R., Phillis, J. W., & Watkins, J.-C. (1961). Cholinergic and non-cholinergic transmission in the spinal chord. *J. Physiol. (Lond.)*, 158, 296-323.
- Dandona, P., Thusu, K., Cook, S., Snyder, B., Makowski, J., Armstrong, D., & Nicotera, T. (1996). Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet*, 347, 444-445.

- Davis, K. L., Mohs, R. C., Rosen, W. G., Greenwald, B. S., Levy, M. I., & Horvath, T. B. (1983). Memory enhancement with oral physostigmine in Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.*, 308, 721-723.
- DCCT Research Group. (1991). Epidemiology of severe hypoglycemia in the diabetes control and complications trial. *Am. J. Med.*, 90, 450-9.
- Deary, I. J., Crawford, J. R., Hepburn, D. A., Langan, S. J., Blackmore, L. M., & Frier, B. M. (1993). Severe hypoglycemia and intelligence in adult patients with insulin-treated diabetes. *Diabetes*, 42, 341-4.
- De Jong, R. N. (1977). CNS manifestations of diabetes mellitus. *Postgrad. Med.*, 61, 101-107.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., & Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptors ion channels. *Pharmacol. Rev.*, 51, n.1, 7-63.
- Di Lucas, M., Ruts, L., Gardoni, F., Biessels, G. J., Gispen, W.H. (1999). NMDA receptor subunits are modified transcriptionally and post-transcriptionally in the brain of streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia*, 42, 693-701.
- Di Simplicio, P., De Giorgio, L. A., Cardaioli, E., Lecis, R., Miceli, M., Rossi, R., Anichini, R., Mian, M., Seghieri, G., & Franconi, F. (1995). Glutathione, glutathione utilizing enzymes and thioltransferase in platelets of insulin-dependent diabetic patients: Relation with platelet aggregation and with microangiopathic complications. *Eur. J. Clin. Invest.*, 25, 665-669.
- Doble A. (1995). Excitatory amino acid receptors and neurodegeneration. *Thérapie*, 50:319-37.

- Draelos, M. T., Jacobson, A. M., Weinger, K., Widow, B., Ryan, C. M., Finkelstein, D. M., & Simonson, D. C. (1995). Cognitive function in patients with insulin-dependent diabetes mellitus during hyperglycemia and hypoglycemia. *Am. J. Med.*, 98 :135-145.
- Dunn, F. L. (1992). Plasma lipid and lipoprotein disorders in IDDM. *Diabetes*, 41, 102-6.
- Dudek, S. E., & Bear, M. F. (1992). Homosynaptic long-term depression in area CA₁ of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *PNAS*, 89, 4363-4367.
- Flood, J. F., Mooradian, A. D., & Morley, J. E. (1990). Characteristics of learning and memory in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes*, 39, 1391-1398.
- Foster, T. C., Gagné, J., & Massicotte, G. (1996). Mechanism of altered synaptic strength due to experience: relation to long-term potentiation. *Brain Res.*, 736, 243-250.
- Fonnum, F. (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. (Review). *Journal of Neurochemistry*. 42(1), 1-11.
- Franceschi, M., Cecchetto, R., Minicucci, F., Smizne, S., Baio, G., & Canal, N. (1984). Cognitive processes in insulin-dependent diabetes. *Diabetes Care*, 7, 228-231.
- Fridovich, I. (1970). Qualitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 245, 4053-4061.
- Gagné, J., Milot, M., Gélinas, S., Lahsaïni, A., Trudeau, F., Martinoli, M.-G., & Massicotte, G. (1997). Binding properties of glutamate receptors in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Diabetes*, 46, 841-846.

- Gallou, G., Ruelland, A., Legras, B., Maugendre, D., Allannic, H., & Cloarec, L. (1993). Plasma malondialdehyde in type 1 and type 2 diabetic patients. *Clin. Chim. Acta*, 214, 227-234.
- Garner, H. W. (1989). Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radic. Biol Med.*, 7, 65-86.
- Gilhaus, K. H., Daweke, H., & Lülldorf, H. G. (1973). EEG Veränderungen bei diabetischen kindern. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 98, 1449-1454.
- Giugliano, D., Ceriello, A., & Paolisso, G. (1996). Oxydative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*, 19, 257-267.
- Godin, D. V., Wohaieb, S. A., Garnett, M. E., & Goumeniouk, A. D. (1988). Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes. *Mol. Cell. Biochem.*, 84, 223-231.
- Golden, M. P., Ingersoll, G. M., Brack, C. J., Russell, B. A., Wright, J. C., & Huberty, T. J. (1989). Longitudinal relationship of asymptomatic hypoglycemia to cognitive function in IDDM. *Diabetes Care*, 12, 89-93.
- Guilhaume, B., & Perlemuter, L. (1976). Endocrinologie, diabète. Paris : *Masson*, 160p.
- Gutteridge, J. M. C. (1993). Free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence. *Free Rad. Res. Comm.*, 19, 141-158.
- Haber, F., & Weiss, J. (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxyde by iron salt. *Proc. Soc. London*, 147, 332-351.

- Haffner, S. M., Agil, A., Mykkanen, L., Stern, M. P., & Jialal, I. (1995). Plasma oxidizability in subjects with normal glucose tolerance, impaired glucose tolerance, and NIDDM. *Diabetes Care*, 18, 646-52.
- Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and central nervous system. *Neurochemistry*, 5, 1609-1615.
- Hanafusa, T., Miyagawa, J-I., Nakajima, H., Tomita, K., Kuwajima, M., Matsuzawa, Y., & Tarui, M. (1994). The NOD mouse. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 24, s307-s311.
- Harman, D. (1956). Aging a theory based on the free radical and radiation chemistry. *Gerontol.*, 11, 298-300.
- Harman, D. (1981). The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78, 7124-7128.
- Haugaard, N. (1968). Cellular mechanisms of oxygen toxicity. *Physiol. Rev.*, 48, 311-373.
- Haumont, D., Dorchy, H., & Pelc, S. (1979). EEG abnormalities in diabetic children: Influence of hypoglycemia and vascular complications. *Clin. Pediatr.*, 18, 750-753.
- Hoffman, R. G., Speelman, D. J., Hinnen, D. A., Conley, K. L., Guthrie, R. A., & Knapp, R. K. (1989). Changes in cortical functioning with acute hypoglycemia and hyperglycemia in type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 12, 193-197.
- Holmes, C. S., Hayford, J. T., Gonzalez, J. L., & Weydert, J. A., (1983). A survey of cognitive functioning at different glucose levels in diabetic persons. *Diabetes Care*, 5, 180-185.

- Isaac, J. T. R., Nicoll, R. A., & Malenka, R. C. (1995). Evidence for silent synapses: Implications for the expression of LTP. *Neuron*, 15, 427-434.
- Jos, J., Rybak, M., Patin, P. H., Robert, J. J., Boitard, C., & Thevenin, R. (1990). Étude des enzymes anti-oxydantes dans le diabète insulino-indépendant de l'enfant et de l'adolescent. *Diabetes Metab.*, 16, 498-503.
- Kakkar, R., Karla, J., Mantha, S. V., & Prasad, K. (1995). Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. *Mol. Cell. Biochem.*, 151, 113-119.
- Katoh, K. (1992). Possible relevance of lipid peroxidation and thromboxane production to the initiation and evolution of microangiopathy in nonhyperlipidemic type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 18, 89-98.
- Keller, B. U., Hollman, M., Heineman, S., & Konnerth, A. (1992). Calcium influx through subunits GluR1/GluR2 of kainate/AMPA receptor channels is regulated by cAMP dependent protein kinase. *EMBO Journal*, 11, 891-896.
- Kolta, M. K., Soliman, K. F. A., & Williams B. B. (1986). Role of 5-hydroxytryptamine in the regulation of brain neuropeptides in normal and diabetic rat. *Horm. Res.*, 23, 112-121.
- Kullmann, D.M. (1994). Amplitude fluctuations of fual-component EPSCs in hippocampal pyramidal cells : Implications for long-term potentiation. *Neuron*, 12, 1111-1120.
- Kwok, R. P. S., & Juorio, A. V. (1986). Concentration of strial tyramine and dopamine metabolism in diabetic rats and effect of insulin administration. *Neuroendocrinology*, 43, 590-596.

- Lackovic, Z., Salkovic, M., Kuci, S., & Relja, M. (1990). Effect of long-lasting diabetes mellitus on rat and human brain monoamines. *J. Neurochem.*, 54, 143-147.
- Lackovic, Z., & Salkovic, M. (1990). Streptozotocin and alloxan produce alterations in rat brain monoamines independently of pancreatic beta cell destruction. *Life Sci.*, 46, 49-54.
- Lafon-Cazal, M., Pietri, S., Culcasi, M., & Bockarert, J. (1993). NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature*, 364, 535-537.
- Larson, J., & Lynch, G. (1988). Rôle of N-methyl-D-aspartate receptors in the induction of synaptic potentiation by burst stimulation patterned after the hippocampal theta rhythm. *Brain Res.*, 441, 111-118.
- Larson, J., Wong, D., & Lynch, G. (1986). Patterned stimulation at the theta frequency is optimal for induction of long-term potentiation. *Brain Res.*, 368, 347-350.
- Lefebvre, J. (1988). Révision accélérée en maladies métaboliques de l'adulte. Paris, *Maloine*, 269p.
- Li, C., Li, P. A., He, Q. P., Ouyang, Y. B., & Siesjö, B. K. (1998). Effects of streptozotocin-induced hyperglycemia on brain damage following transient ischemia. *Neurobiol. Disease*, 5, 117-128.
- Li, N., Young M. M., Bailey, C.J., & Smith, M. E. (1999). NMDA and AMPA receptor subtype in the thoracic spinal cord in lean and obese-diabetic ob/ob mice. *Brain Res.*, 849, 34-44.

- Liao, D., Hessler, N. A., & Malinow, R. (1995). Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA₁ region of hippocampal slice. *Nature*, 375, 400-404.
- Luft, R. (1994). The development of mitochondrial medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 8731-8738.
- Mak, D. H., Ip, S. P., Li, P. C., Poon, M. K., & Ko, K. (1996). Alterations in tissue glutathione antioxidant system in streptozotocin induced diabetic rats. *Mol. Cell Biochem.*, 162, 153-158.
- Malenka, R. C. (1994). Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell*, 78, 535-538.
- Man, H-Y., Lin J. W., Ju W. H., Ahmadian, G., Liu, L., Becker, L. E., Sheng, M., & Wang, Y. T. (2000). Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. *Neuron*, 25, 649-662.
- Manabe, T., and Nicoll, R.A. (1994). Long-Term Potentiation: Evidence Against an Increase in Transmitter Release Probability in the CA₁ Region of the Hippocampus. *Science*, 265, 1888-1892.
- Martinovits, G., Melamed, E., Cohen, O., Rosenthal, J., & Uzzan, A. (1986). Systemic administration of antioxidants does not protect mice against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Neurosciences*, 69, 192-197.
- Massicotte, G., & Baudry, M. (1991). Triggers and substrates of hippocampal synaptic plasticity. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 15, 415-423.

- Massicotte, G., Vanderklish, P., Lynch, G., & Baudry, M. (1991). Modulation of AMPA/Quisqualate receptors by phospholipase A₂: A necessary step in long-term potentiation *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 88, 1893-1897.
- Matkovics, B., Varga, S. I., Szabo, L., & Witas, H. (1982). The effect of diabetes on the activities of the peroxide metabolism enzymes. *Horm. Metab. Res.*, 14, 77-9.
- Mayer, M.L., & Westbrook, G.L. (1987). The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog. Neurobiol.*, 28, 197-276.
- McBain, C. J., & Mayer, M. L. (1994). N-Methyl-Daspartic Acid receptor structure and function. *Physiological Reviews*, 74, n.3, 723.
- Messier, C., & Gagnon, M. (1996). Glucose regulation and cognitive functions : Relation to Alzheimer's disease and diabetes. *Behav. Brain Res.*, 75, 1-11.
- Meuter, F., Thomas, W., & Gruneklee, D. (1980). Psychometric evaluation of performance in diabetes mellitus. *Horm. Metab. Res.*, 9, 9-17.
- Mooradian, A. D. (1987). Blood-brain barrier choline transport is reduced in diabetic rats. *Diabetes*, 36, 1094-1097.
- Mooradian, A. D., Perryman, K., Fitten, J., Kavonian, G., & Morley, J.E. (1988). Cortical function in elderly non-insulin dependent diabetic patients: Behavioral and electrophysiological studies. *Arch. Intern. Med.*, 148, 2369-2372.
- Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N., & Nakanishi, S. (1991). Molecular cloning and characterisation of the rat NMDA receptor. *Nature*, 354, 31-37.

- Morris, R. G. M., Anderson, E., Lynch, G., & Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP-5. *Nature*, 319, 774-776.
- Musleh, W., Bruce, A., Malfroy, B., & Baudry, M. (1994). Effects of EUK-8, a synthetic catalytic superoxide scavenger, on hypoxia and acidosis-induced damage in hippocampal slices. *Neuropharmacology*, 33, 922-934.
- Nakashima, E., Ishizaki, J., Takeda, M., Matsushita, R., Yokogawa, K., & Ichimura, F. (1993). Pharmacokinetics of anticholinergic drugs and brain muscarinic receptor alterations in streptozotocin diabetic rats. *Biopharm. Drug Dispos.*, 14, 673-684.
- Ohtsuki, T., & Kamada, T. (1995). Reperfusion induces 5-lipoxygenase translocation and leukotriene C₄ production in ischemic brain. *Physiology*, H1249-H1257.
- Pacifici, R. E., & Davies, K. J. A. (1991). Protein lipid and DNA repair systems in oxidative stress: The free radical theory of aging revisited. *Gerontology*, 37, 166-180.
- Pereira, C., Moreira, P., Seiça, R., Santos, M. S., & Oliveira, C. R. (2000). Susceptibility to β -amyloid-induced toxicity is decreased in Goto-Kakizaki Diabetic rats: Involvement of oxidative stress. *Exp. Neurol.*, 161, 383-391.
- Perlmutter, L.C., Hakami, M. K., Hodgson-Harrington, C., Ginsberg, J., Katz, J., Singer, D. E., & Nathan, D. M. (1984). Decreased cognitive function in aging non-insulin-dependent diabetic patients. *Am. J. Med.*, 77, 1043-1048.
- Perlmutter, L. C., Tun, P., Sizer, N., McGlinchey, R. E., & Nathan, D. M. (1987). Age and diabetes related changes in verbal fluency. *Experimental Aging Research*, 13, 9-14.

- Pieper, G. M., Jordan, M., Dondlinger L. A., Adams, M. B., & Roza, A. M. (1995). Peroxidative stress in diabetic blood vessels. Reversal by pancreatic islet transplantation. *Diabetes*, 44, 884-889.
- Pirart, J. (1978). Diabetes mellitus and its degenerative complications: A prospective study of 4,400 patients observed between 1947 and 1973. *Diabetes Care*, 1, 252-263.
- Porter, N. A. (1984). Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 105, 273-282.
- Pulsinelli, W. A., Levy, D. E., Sigsbee, P., & Plum, F. (1983). Increased damage after ischemic stroke in patients with hyperglycemia with or without established diabetes mellitus. *Am. J. Med.*, 74, 540-544.
- Reagan, L. P., Magarinos, A. M., Yee, D. K., Swzeda, L. I., Van Bueren, A., McCall, A. L., & McEwen, B. S. (2000). Oxidative stress and HNE conjugation of GluT3 are increased in hippocampus of diabetic rats subjected to stress. *Brain Res.*, 862, 292-300.
- Reichard, P., Berglund, A., Britz, A., Levander, S., & Rosenqvist, U. (1991). Hypoglycaemic episodes during intensified insulin treatment: increased frequency but no effect on cognitive function. *J. Intern. Med.*, 229, 9-16.
- Richardson, J. T. (1990). Cognitive function in diabetes mellitus. *Neurosci Biobehav. Rev.*, 14, 385-8.
- Rovet, J., & Alvarez, M. (1997). Attentional functioning in children and adolescents with IDDM. *Diabetes Care*, 20, 803-10.

- Rovet, J. F., Ehrlich, R. M., & Hoppe, M. (1987). Intellectual deficits associated with early onset of insulin-dependent diabetes mellitus in children. *Diabetes Care*, 10, 510-5.
- Russell, J. W., Sullivan, K. E., Windebank, A. J., Herrmann, D. N., & Feldman, E. L. (1999). Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes. *Neurobiol. Disease*, 6, 347-363.
- Ryan, C., Vega, A., & Longstreet, C. (1984). Neuropsychological changes in adolescents with insulin-dependent diabetes. *J. Consult. Clin. Psychol.*, 52, 335-342.
- Ryan, C., Vega, A., & Drash, A. (1985). Cognitive deficits in adolescents who developed diabetes early in life. *Pediatrics*, 75, 921-927.
- Ryan, C. M. (1988). Neurobehavioral complications of type I diabetes. Examination of possible risk factors. *Diabetes Care*, 11, 86-93.
- Ryan, C. M., Williams, T. M., Orchard, T. J., & Finegold, D. N. (1992). Psychomotor slowing is associated with distal symmetrical polyneuropathy in adults with diabetes mellitus. *Diabetes*, 41, 107-113.
- Ryan, C. M., Williams, T. M., Finegold, D. N., & Orchard, T. J. (1993). Cognitive dysfunction in adults with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus of long duration: Effects of recurrent hypoglycaemia and other chronic complications. *Diabetologia*, 36, 329-34.
- Saller, C. S. (1984). Dopaminergic activity is reduced in diabetic rats. *Neurosci. Lett.*, 49, 301-306.
- Sato, Y., Hotta, N., & Sakamoto, N. (1979). Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. *Biochem. Med.*, 21, 104-107.

Semenkovich, C. F., & Heinecke, J. W. (1997). The mystery of diabetes and arteriosclerosis. Time for a new plot. *Diabetes*, 46, 327-334.

Shors, T. J., & Matzel, L. D. (1997). Long-term potentiation: What's learning got to do with it? *Behav. Brain Res.*, 20, 597-655.

Siesjo, B. K. (1988). Historical overview: Calcium, ischemia and death of brain cells. *Ann. NY Acad. Sci.*, 522, 638-661.

Siesjo, B. K. (1989). Calcium and cell death. *Magnesium*, 8, 223-37.

Siesjo, B. K., Bengtsson, F., Grampp, W., Theander, S. (1989). Calcium, excitotoxins, and neuronal death in the brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 568, 234-51..

Siesjo, B. K., Zhao, Q., Phalmark, K., Siesjo, P., Katsura, K., & Folbergrova, J. (1995). Glutamate, calcium, and free radicals as mediators of ischemic brain damage. *Ann. Thor. Surg.*, 59, 1316-1320.

Steriade, M., Gloor, P., Llinas, R. R., Lopes da Silva, F. H., & Mesulam, M. M. (1990). Basic mechanisms of cerebral rhythmic activities. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 76, 481-508.

Strachan, M. W. J., Deary, I. J., Ewing, F. M. E., & Frier, B. M. (1997). Is type II diabetes associated with an increased risk of cognitive dysfunction? A critical review of published studies. *Diabetes Care*, 20, 438-45.

Subbarao, K. V., Richardson, J. S., & Ang, L. C. (1990). Autopsy of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro. *Neurochem.*, 55, 342-345.

- Surridge, D. H. C., Williams Erdahl, D. L., Lawson, J. S., Donald, M. W., Monga, T. N., Bird, C. E., & Letemendia, F. J. J. (1984). Psychiatric aspects of diabetes mellitus. *Br. J. Psychiatry*, 145, 269-276.
- Svendsen, F., Tjolsen, A., Hole, K. (1998). AMPA and NMDA receptor-dependent spinal LTP after nociceptive tetanic stimulation. *Neuroreport*, 9, 1185-90.
- Svendsen, F., Tjolsen, A., Rygh, L. J., Hole, K. (1999). Expression of long-term potentiation in single wide dynamic range neurons in the rat is sensitive to blockade of glutamate receptors. *Neuroscience Letters*, 259, 25-28.
- Taupin, J. M., Dulach, V., Hassaim, M., Gillery, P., Jolly, D., Boirie, Y., Grulet, H., & Leutenegger, M. (1993). Lipoprotéine (a) et diabète : Relations à propos de 224 observations. *Diabetes Metab.*, 19, 250-6.
- Takasu, N., Komiya, I., Asawa, T., Nagasawa, Y., & Yamada, T. (1991). Streptozotocin- and alloxan-induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. *Diabetes*, 40, 1141-1145.
- Toleikis, P. M., Godin, D. V. (1995). Alteration of antioxydant status in diabetic rats by chronic exposure to psychological stressor. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 52, 355-366.
- Tortora, G. J., & Grabowski, S. R. (1994). Principes d'anatomie et de physiologie. Bruxelles, *De Boeck-Wesmael*, 1204p.
- Traub, O., & Van Bibber, R. (1995). Role of nitric oxide in insulin-dependent diabetes mellitus-related vascular complications. *West J. Med.*, 162, 439-445.

- Trulson, M. E., & Himmel, C. D. (1983). Decreased brain dopamine synthesis rate and increased 3H-spiroperidol binding in Streptozotocin-diabetic rats. *J. Neurochem.*, 40, 1456-1459.
- Trulson, M. E., Jacoby, J. H., & MacKenzie, R. G. (1986). Streptozotocin-induced diabetes reduces brain serotonin synthesis in rats. *J. Neurochem.*, 46, 1068-1072.
- Tun, P. A., Nathan, D. M., & Perlmutter, L. C. (1990). Cognitive and affective disorders in elderly diabetics. *Clin. Geriatr. Med.*, 6, 731-46.
- Tuomilehto, J., Rastenyte, D., Jousilahti, P., Sarti, C., & Vartiainen, E. (1996). Diabetes mellitus as a risk factor for death from stroke : Prospective study of the middle-aged Finnish population. *Stroke*, 27, 210-215.
- Valastro, B., Girard, M., & Massicotte, G. (May 2000). Regulation of glutamatergic receptor in NOD mice. *Society for neuroscience*, San Diego 2001.
- Watkins, J. C., Krogsgaard-Larsen, P., & Honore, T. (1990). Structure activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.*, 11, 25-33.
- Welsh, B., & Wecker, L. (1991). Effects of streptozotocin-induced diabetes on acetylcholine metabolism in rat brain. *Neurochem. Res.*, 16, 453-460.
- Zhang, L., Maiorino, M., Roveri, A., & Ursini, F. (1989). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase : Specific activity in tissues of rats of different age and comparison with other glutathione peroxidases. *Bioch. Biophys. Acta.*, 1006, 140-143.